

# **Avaliação da tolerância ao frio em híbridos de *Eucalyptus* spp.**

**Rute da Costa Nogueira**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais**

Orientadores: Professora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida  
Professor Filipe Miguel de Carvalho Costa e Silva

**Júri:**

Presidente: Doutora Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira, Professora auxiliar,  
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogal: Doutor Filipe Miguel de Carvalho Costa e Silva, Professor auxiliar, Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogal: Doutora Teresa Maria Santana Barreto Soares David, Investigadora auxiliar,  
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

## **Agradecimentos**

Esta dissertação teve o contributo indispensável de várias pessoas, a quem quero deixar o meu mais sincero agradecimento. Sem a sua colaboração, certamente a batalha teria sido mais penosa.

Aos meus orientadores, Professora Maria Helena Almeida e Professor Filipe Costa e Silva, pela paciência, amizade e pelo apoio ao longo de todo o processo, e acima de tudo por nunca terem desistido de mim e deste trabalho, mesmo quando as dificuldades operacionais e logísticas foram evidentes desde a fase inicial do trabalho. Devido à sua persistência e por acreditarem em mim, devo-lhes o impulsionamento da minha carreira.

À Altri Florestal e Viveiros do Furadouro, pela disponibilização das plantas, e em particular ao Eng<sup>o</sup> Luís Leal, pelo interesse constante neste trabalho, sem o seu apoio não teria sido possível sequer avançar com este trabalho. Ao José Augusto Ventura, pela simpatia e disponibilidade na colaboração da recolha dos ramos no ensaio de campo.

À sempre presente e amiga Ana Rodrigues, por toda a ajuda indispensável na determinação dos açúcares e clorofilas, e em todos os outros momentos de desespero, além da preocupação na procura de soluções quando o cenário era pouco favorável.

Ao Dr. José Cochicho Ramalho, pela disponibilização do laboratório e da estufa no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (Estação Agronómica Nacional) para a realização dos testes de frio, pela disponibilidade e ajuda durante todo o processo, e pelas horas extra que lhe tomei.

À Carla Faria, por ter ajudado prontamente sempre que foi necessário e pelo cuidado e atenção com as plantas enquanto estiveram no viveiro do ISA.

À D. Lurdes e D. Madalena, que apoiaram não só na logística do trabalho laboratorial, mas também pela sua boa energia e simpatia, deixaram o meu trabalho mais leve.

Aos meus agora chefes e coordenadores, Eng<sup>a</sup> Ivone Neves, Eng<sup>o</sup> Luís Leal, Dr. Luís Fontes e Eng<sup>o</sup> Mário Louro, pela amizade e incentivo constantes, e pelos dias que me permitiram dedicar à conclusão desta dissertação.

Guardo um agradecimento particular aos meus pais e avós, por todo o apoio, compreensão e motivação que sempre recebi não só durante os meus estudos, como em tudo o que sempre necessitei. E por fim, ao meu não só companheiro, como melhor amigo António Galla, por estar presente quando mais preciso, e por todo o amor e amizade que sempre me dedicou e que espero poder retribuir durante muitos mais anos.

## Resumo

O eucalipto é uma espécie sensível à geada, nomeadamente às que ocorrem fora de época, quando as plantas não estão aclimatadas, aumentando o risco de danos. Foram testados seis clones (um *E. globulus* puro e cinco híbridos da espécie) para avaliar a sua capacidade de tolerar as baixas temperaturas em condições de viveiro e sem período de aclimação, por estimativa da temperatura que causa 50% de mortalidade ( $TL_{50}$ ), através do método da condutividade elétrica. Igualmente, foi testado material vegetal dos mesmos clones (folhas jovens e adultas) recolhido num ensaio de campo. O híbrido que evidenciou maior tolerância nas condições de viveiro foi o *E. globulus* x *E. cypellocarpa* (YG15), com uma  $TL_{50}$  de -4.1 °C. O híbrido mais sensível foi uma família de *E. globulus* x *E. nitens* (Hib 1B), com  $TL_{50}$  de -3.4 °C. Nas condições de campo, tanto nas folhas jovens como adultas, o híbrido com menos danos foi o (*E. viminalis* x *E. globulus*) x *E. dunnii* (Hib 3). Nas folhas jovens, o híbrido com mais lesões foi o *E. globulus* x *E. cypellocarpa* (YG15), e nas folhas adultas o *E. globulus* x *E. nitens* (Hib 1). Alguns aspetos importantes foram evidenciados neste trabalho: 1) A amplitude de 0.68 °C entre a  $TL_{50}$  do clone mais sensível e do mais tolerante indica uma variabilidade interessante a ser explorada em termos de melhoramento, sobretudo considerando uma amostragem em larga escala; 2) Esta amplitude de  $TL_{50}$  entre genótipos é relevante se considerarmos a suscetibilidade ao frio do *E. globulus* e as temperaturas que ocorrem nas condições naturais de plantação desta espécie; 3) O clone puro *E. globulus* (AC-58), obteve resultados promissores quanto à sua resistência às baixas temperaturas em condições de viveiro e de campo, permanecendo na segunda posição em ambas as hierarquias de tolerância ao frio.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus globulus*, híbridos de eucalipto, tolerância ao frio, danos de frio,  $TL_{50}$ .

## Abstract

*Eucalypts globulus* is frost-sensitive, particularly when early or late frost occur, as plants are not acclimated to low temperatures. Six clones (one pure *E. globulus*, and five hybrids of this species) were tested to assess their ability to tolerate freezing temperatures under nursery conditions and without cold acclimation, by estimating the lethal temperature for 50% of the plants ( $LT_{50}$ ) by the electrical conductivity method. In addition, plant material (young and adult leaves) from the same clones was collected from a field trial and tested. In nursery conditions the hybrid *E. globulus* x *E. cypellocarpa* (YG15) showed the highest cold tolerance with a  $LT_{50}$  of -4.1 °C. Conversely, the most sensitive was *E. globulus* x *E. nitens* (Hib 1B), with a  $LT_{50}$  of -3.4 °C. Under field conditions, for both young and adult leaves, the least damaged hybrid was (*E. viminalis* x *E. globulus*) x *E. dunnii* (Hib 3). The most cold damaged hybrid were *E. globulus* x *E. cypellocarpa* (YG15) and *E. globulus* x *E. nitens* (Hib 1) in young and adult leaves, respectively. Some important aspects were highlighted in this work: 1) The 0.68°C amplitude between the  $LT_{50}$  of the most sensitive and tolerant clone indicates an interesting variability to be exploited in terms of breeding, especially considering a large scale sampling; 2) This  $LT_{50}$  amplitude between genotypes is relevant considering the cold susceptibility of *E. globulus* and the temperatures that occur under the natural plantation conditions of this species; 3) The pure *E. globulus* clone (AC-58) obtained promising results regarding its ability to resist freezing under both nursery and field conditions, remaining in the second position in both rankings.

**Keywords:** *Eucalyptus globulus*, eucalyptus hybrids, cold tolerance, cold damage,  $LT_{50}$ .

## Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Índice .....	vi
Lista de figuras .....	viii
Lista de quadros .....	ix
1. Introdução .....	1
1.1. Eucalipto: contexto nacional e programas de melhoramento .....	1
1.2. Produção de híbridos .....	2
1.3. Geadas e baixas temperaturas em Portugal Continental .....	5
1.4. As baixas temperaturas como condicionantes da produtividade .....	8
1.5. Respostas das plantas às baixas temperaturas .....	9
1.5.1. Processo de congelamento .....	9
1.5.2. Efeitos do congelamento e mecanismos de defesa das plantas..	11
1.6. Enquadramento e objetivos do estudo .....	14
2. Material e Métodos .....	15
2.1. Material Vegetal .....	15
2.1.1. Material Vegetal de viveiro .....	15
2.1.2. Material Vegetal de campo .....	16
2.2. Testes de frio e quantificação dos danos foliares .....	18
2.2.1. Testes de frio .....	18
2.2.2. Quantificação dos danos foliares.....	19
2.3. Caracterização morfológica e bioquímica .....	20
2.3.1. Caracterização morfológica .....	20
2.3.2. Caracterização bioquímica .....	20
2.4. Análise Estatística .....	22
3. Resultados .....	22
3.1. Material vegetal de viveiro .....	22
3.1.1. Alturas, diâmetros e área foliar específica .....	22
3.1.2. Clorofilas .....	23
3.1.3. Açúcares solúveis .....	24
3.1.4. Danos de frio .....	25
3.2. Material vegetal de campo .....	27
3.2.1. Área foliar específica .....	27
3.2.2. Clorofilas .....	27

3.2.3. Açúcares solúveis .....	29
3.2.4. Danos de frio .....	30
4. Discussão .....	32
5. Conclusão .....	38
6. Bibliografia .....	39

## Lista de figuras

Figura 1. Distribuição da média das temperaturas mínimas registadas em fevereiro de 2012 em Portugal Continental .....	6
Figura 2. Distribuição da aptidão do eucalipto em Portugal Continental .....	6
Figura 3. Diagrama com representação esquemática do papel desempenhado pelos açúcares solúveis sob diversos stresses abióticos .....	14
Figura 4. Características do substrato utilizado na transplantação dos eucaliptos .....	16
Figura 5. Clones amostrados no ensaio de campo no Furadouro ilustrando as diferenças morfológicas e a influência dos progenitores .....	17
Figura 6. Concentração de clorofila total ( $\text{g m}^{-2}$ ) nas folhas dos clones em condições de viveiro .....	24
Figura 7. Concentração em: A - glucose, frutose e sacarose ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ); B – Açúcares solúveis totais ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ), nas folhas dos clones de viveiro .....	25
Figura 8. Relação entre os açúcares solúveis totais ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ) e o parâmetro $\text{TL}_{50}$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) para cada rameto testado .....	26
Figura 9. Concentração de clorofila total ( $\text{g m}^{-2}$ ) nas folhas dos clones no ensaio de campo .....	28
Figura 10. Concentração em glucose, frutose e sacarose ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ) das folhas jovens (A) e das folhas adultas (B) do ensaio de campo .....	29
Figura 11. Concentração de açúcares solúveis totais ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ) das folhas jovens e adultas dos clones do ensaio de campo .....	30



## Lista de quadros

Quadro 1. Valores mais baixos da temperatura mínima absoluta registada em Portugal Continental no inverno de 2011/2012.....	5
Quadro 2. Identificação do material clonal selecionado para as condições de viveiro e respetivos progenitores masculinos e femininos .....	16
Quadro 3. Identificação do material clonal amostrado no ensaio de campo por grupos de clones/famílias consideradas .....	17
Quadro 4. Altura, diâmetro e área foliar específica (SLA) dos clones do material vegetal de viveiro .....	23
Quadro 5. Concentrações de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> (C <sub>lof a</sub> e C <sub>lof b</sub> ) e razão entre clorofila <i>a</i> e <i>b</i> (C <sub>lof a/b</sub> ) (g m <sup>-2</sup> ) dos clones em condições de viveiro .....	23
Quadro 6. Danos Relativos ( <i>Relative Injury</i> , <i>RI</i> %) e estimativa do parâmetro TL <sub>50</sub> (°C) dos clones em condições de viveiro, com base nos testes de frio a -3.1 ± 0.01 °C, -4.1 ± 0.02 °C e -5.0 ± 0.01 °C .....	26
Quadro 7. Área foliar específica, SLA (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) de folhas novas e adultas amostradas no ensaio de campo .....	27
Quadro 8. Concentrações de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> (C <sub>lof a</sub> e C <sub>lof b</sub> ) e razão entre clorofila <i>a</i> e <i>b</i> (C <sub>lof a/b</sub> ) (g m <sup>-2</sup> ) nas folhas dos clones do ensaio de campo .....	28
Quadro 9. Danos relativos ( <i>Relative Injury</i> , <i>RI</i> %) dos clones do ensaio de campo com base num teste de frio a -4.5 ± 0.01 °C .....	31
Quadro 10. Correlações de Pearson entre os danos relativos de frio ( <i>Relative Injury</i> , <i>RI</i> %) e a concentração de açúcares solúveis e totais para os clones do ensaio de campo .....	31

## 1. Introdução

### 1.1. Eucalipto: contexto nacional e programas de melhoramento

O género *Eucalyptus* inclui mais de 700 espécies (na sua maioria originárias da Austrália) com uma ampla capacidade de adaptação a vários tipos de condições edafo-climáticas, desde habitats subalpinos a floresta tropical húmida (Teulières *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2007). Apesar da diversidade de espécies existente, atualmente apenas uma pequena percentagem com interesse económico é plantada globalmente (Teulières *et al.*, 2007).

Em Portugal, o *Eucalyptus globulus* Labill. é a espécie mais utilizada comercialmente (Teulières *et al.*, 2007) e a que ocupa maior área florestal, com base no 6º Inventário Florestal Nacional – 26% da área de floresta (ICNF, 2013). Com ocorrência natural na Austrália (Tasmânia e Vitória) e de climas temperados, tem capacidade de se adaptar às regiões de clima mediterrânico com invernos suaves (Pereira, 2007). Distribui-se de Norte a Sul do país, do litoral ao interior, desde o nível do mar até 400-500 m de altitude, em solos arenosos, xistosos e outros, desde que bem drenados e húmidos (Marques *et al.*, 2012).

A crescente expansão do eucalipto nas últimas décadas deve-se principalmente à qualidade superior do lenho, fundamental como matéria-prima para a obtenção de pasta para papel para a indústria da celulose, aliada a ser uma espécie de rápido crescimento e de elevada produtividade adaptada às condições edafo-climáticas de muitas regiões do país (Borrinho *et al.*, 2007). Idealmente é explorado em rotações de 12 anos, permitindo três a quatro cortes, o que o torna uma espécie bastante rentável (Soares *et al.*, 2007). A relevância do eucalipto na economia portuguesa reflete o aumento da área desta espécie, sendo que o sector industrial papeleiro é responsável por cerca de 5% do total das exportações portuguesas de mercadorias e bens (Celpa, 2018).

Devido à sua importância a nível económico, há mais de 50 anos que o melhoramento genético desta espécie tem sido alvo de financiamento pela indústria da celulose, sendo que são as empresas do sector que gerem os programas de melhoramento do eucalipto. A utilização de plantas melhoradas por estas empresas nas arborizações teve início em 1991 (Almeida *et al.*, 2005) e na maioria das suas arborizações é efetivamente utilizado material melhorado e testado nos seus próprios programas de melhoramento (Altri, 2019).

O sucesso dos programas de melhoramento do eucalipto está dependente do valor genético das plantas utilizadas, da proporção do material melhorado utilizado nas plantações e do respetivo comportamento e adaptação às condições de campo. O aperfeiçoamento das técnicas silvícolas e de instalação, bem como o modo de condução e exploração dos povoamentos, são também fatores que influenciam o impacto do melhoramento nas plantações de eucalipto (Almeida *et al.*, 2005).

De um modo geral, os principais objetivos dos programas de melhoramento genético do eucalipto têm-se focado na maximização da produtividade dos povoamentos e nas características tecnológicas do lenho de qualidade superior, nomeadamente, no volume por hectare, rendimento em pasta e densidade da madeira (Borrinho *et al.*, 2007).

O grau de adaptabilidade a fatores de *stress* bióticos e abióticos, teve no passado uma importância secundária na seleção de indivíduos nos programas de melhoramento em Portugal (Costa e Silva, 2008). No entanto, a crescente procura de matéria-prima para a indústria da celulose tem conduzido muitas vezes à instalação das plantações em locais com condições pouco ajustadas à espécie (Costa e Silva *et al.*, 2009), levando à necessidade de alterar as estratégias dos programas de melhoramento. Esta necessidade é reforçada no quadro atual de alterações climáticas em que são previstas secas mais frequentes e com maior duração e a ocorrência de eventos meteorológicos extremos (IPCC 2014). A seleção de populações e indivíduos mais eficientes em termos produtivos, com maior capacidade adaptativa a condições edafoclimáticas adversas, é uma preocupação que tem vindo a ser implementada há alguns anos (Almeida *et al.*, 2005; Navarrete-Campos *et al.*, 2013). Assim, nos trabalhos de melhoramento das últimas décadas, têm sido realizados esforços para incluir genótipos superiores que combinem as melhores características da madeira para a pasta celulósica, com características como a tolerância à seca, frio, salinidade ou determinadas pragas e doenças que afetam as plantações de eucalipto.

## **1.2. Produção de Híbridos**

A maior contribuição dos programas de melhoramento para a indústria da celulose é a sua capacidade de disponibilizar indivíduos superiores que efetivamente permitam obter ganhos na plantação, no processo industrial e na qualidade do produto final. Neste contexto, a hibridação é bastante promissora pela possibilidade de combinar características desejáveis entre espécies e criar genótipos superiores através de fenómenos como a heterose, um efeito de superioridade ou “vigor híbrido”, em que as

espécies progenitoras em ambientes específicos têm um desempenho inferior aos seus híbridos (de Assis, 2000; Potts *et al.*, 2000; Potts *et al.* 2011).

A capacidade de hibridação por parte de algumas espécies do gênero *Eucalyptus*, leva ao constante interesse e desenvolvimento de híbridos interespecíficos (Griffin *et al.* 1988; Potts & Dungey, 2004; Potts *et al.*, 2011). Um dos principais desafios para o melhorador é o uso de estratégias eficientes para maximizar a produtividade (mantendo as características desejáveis da madeira para a pasta celulósica), aliado ao aumento da resistência a fatores bióticos e abióticos, que podem causar danos ou mortalidade nas plantações.

O sucesso para a implementação de híbridos está, no entanto, fortemente dependente do local de plantação, das espécies utilizadas e da seleção de progenitores com genótipos superiores, além da viabilidade do cruzamento e capacidade do híbrido para a propagação vegetativa (de Assis, 2000; Potts & Dungey, 2004). A hibridação entre espécies pertencentes a diferentes subgêneros raramente ocorre, quer natural ou artificialmente, apesar de híbridos do mesmo subgênero serem frequentes (Griffin *et al.* 1988). Verificou-se que a frequência de barreiras à hibridação e o insucesso reprodutivo aumentam com a distância taxonômica entre os progenitores (Dickinson *et al.*, 2012).

Existem, no entanto, vários relatos de combinações interespecíficas de *Eucalyptus* bem-sucedidas e com registo de desempenho superior em relação às espécies puras, como as combinações com *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* utilizadas em vários países com clima subtropical como o Brasil, Congo e África do Sul (Volker, 1995). O sucesso no uso comercial de híbridos conduziu à sua introdução nos programas de melhoramento de várias regiões do mundo, com problemáticas distintas.

Nas zonas de clima temperado, as temperaturas baixas e a ocorrência de geadas súbitas são das principais limitações à expansão e sobrevivência de *E. globulus*, por esta ser uma espécie considerada sensível ao frio. Em contrapartida, num estudo de Tibbits *et al.* (2006), em que se avaliou a tolerância ao frio em 477 famílias de *E. globulus* Labill., foi reportada uma significativa variação genética na resistência à geada invernal, ao nível das proveniências e das famílias. Os resultados deste trabalho indicaram que as famílias mais resistentes e aclimatadas às temperaturas inverniais, toleraram temperaturas inferiores a -1.4 °C em relação à média de outras famílias em estudo. Outros autores têm demonstrado a variabilidade intraespecífica desta característica, com algumas famílias de *E. globulus* aclimatadas a tolerar temperaturas entre -7.5 °C a

-8.8 °C (Almeida *et al.*, 1994; Volker, 1994; Moraga *et al.*, 2006; Tibbits *et al.*, 2006; Costa e Silva *et al.*, 2009, Coopman *et al.*, 2010).

Pryor (1957) sugeriu quatro linhas de investigação a ser exploradas na seleção de eucaliptos tolerantes ao frio: avaliar a variação 1) entre espécies, 2) entre famílias e proveniências da própria espécie, 3) entre híbridos naturais e 4) híbridos artificiais. Vários estudos têm identificado algumas espécies de *Eucalyptus* como relativamente tolerantes ao frio após sujeitas a um período de aclimação, como *E. nitens* e *E. gunnii*, que toleraram temperaturas de -14 °C (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1989; Leslie *et al.*, 2014); e *E. dalrympleana* e *E. viminalis* a tolerar -12 °C e -9 °C, respetivamente (Valentini *et al.*, 1990). Estes resultados indicam que explorar a variabilidade ao nível da espécie, das famílias e proveniências quanto à resposta ao frio pode permitir que sejam alcançados ganhos genéticos consideráveis na hibridação através da seleção de indivíduos puros superiores como progenitores.

Em locais onde as baixas temperaturas e as geadas são um fator limitante à sobrevivência e produtividade das plantações, o *E. globulus* é substituído frequentemente por *E. nitens*, pela sua menor sensibilidade ao frio e rápido crescimento (Volker *et al.*, 1994). De facto, quando o objetivo é garantir a melhor qualidade do lenho, produtividade e diminuir a suscetibilidade ao frio, o híbrido *E. nitens* x *E. globulus* é proposto como uma das principais combinações a adotar (Potts *et al.*, 2000; Volker *et al.*, 2008). Entre outras, o híbrido entre *E. gunnii* x *E. globulus* é também uma combinação considerada com frequência, por permitir também aliar os genes de qualidade da madeira de *E. globulus*, com uma espécie referida como resistente ao frio (Potts *et al.*, 2000; Navarrete-Campos *et al.*, 2013).

Por sua vez, Tibbits *et al.* (1991) investigaram a transmissão da tolerância ao frio em diversas combinações de híbridos F<sub>1</sub> (primeira geração de descendentes resultante do cruzamento entre duas espécies puras diferentes). Os resultados sugeriram que em algumas combinações, como *E. gunnii* x *E. globulus* e *E. nitens* x *E. globulus*, esta característica é herdada de maneira predominantemente aditiva, com tendência a dominância parcial em relação à espécie progenitora mais sensível. E embora altos níveis de anomalias e mortalidade tenham sido observados em famílias híbridas de *E. globulus* x *E. nitens*, os indivíduos sobreviventes apresentaram fenótipo normal e vigor comparável às espécies puras, sendo geralmente intermédios na resistência ao frio, o que demonstra que apesar das desvantagens, é possível a seleção eficaz de genótipos (Potts *et al.*, 1992; Volker *et al.*, 2008).

### 1.3. Geadas e baixas temperaturas em Portugal Continental

Embora nas condições climáticas mediterrânicas não ocorram frequentemente temperaturas que causem a mortalidade do eucalipto (Faria *et al.*, 1997), a ocorrência de eventos meteorológicos súbitos de temperaturas mínimas absolutas inferiores a -4°C ou de ondas de frio<sup>1</sup> são relevantes. Por acréscimo, a previsão de episódios climáticos extremos, com geadas mais frequentes e imprevisíveis devido às alterações climáticas (IPCC, 2014) colocam em risco a produtividade e mesmo a sobrevivência das plantas (Almeida, 1993; Costa e Silva *et al.*, 2009).

Por exemplo, recuando ao ano de 2012, no mês de fevereiro em particular, foi registada uma onda de frio em 13 estações meteorológicas analisadas (de um total de 38), distribuídas pelas diferentes regiões de Portugal Continental (INE, 2013). As estações com maior número de dias consecutivos registados em onda de frio foram Alcácer do Sal (20 dias), Abrantes/Alvega (19 dias) e Santiago do Cacém/Alvalade (18 dias), localizadas nas regiões Centro e Alentejo, regiões em que as plantações de eucalipto têm uma presença considerável. De um modo geral, fevereiro de 2012 caracterizou-se como um mês em que se verificou a persistência de valores muito baixos da temperatura mínima do ar, com vários dias com valores negativos em muito locais do país, sendo mesmo considerado como o segundo fevereiro com o menor valor da temperatura mínima desde 1931, muito inferior ao valor normal entre o período de 1971-2000 (Boletim Climatológico Sazonal – inverno, IPMA, 2012). No Quadro 1 podem ser visualizados os valores mais baixos da temperatura mínima absoluta registados para o inverno 2011/12 em Portugal Continental.

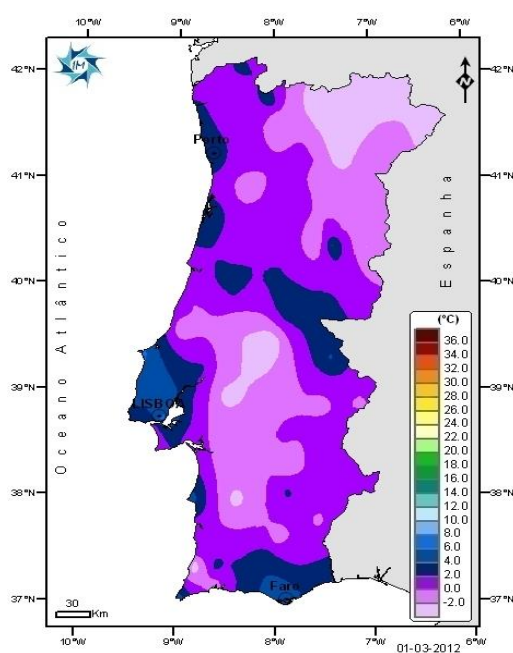
**Quadro 1** - Valores mais baixos da temperatura mínima absoluta registada em Portugal Continental no inverno de 2011/2012 (IPMA, 2012).

Estações meteorológicas	Menor temperatura Inverno 2011/12	Data
Miranda do Douro	-10.2	4 Fev.
Carraceda Ansiães	-10.2	4 Fev.
Bragança	-9.2	13 Fev.
Penhas Douradas	-8.4	3 Fev.
Mirandela	-8.3	4 Fev.
Chaves	-8.2	4 Fev.
Lamas de Mouro	-7.9	4 Fev.
Sabugal	-7.9	4 Fev.
Montalegre	-7.7	4 Fev.
Macedo de Cavaleiros	-7.6	13 Fev.
Alvega	-7.5	10 Fev.
Alvalade	-7.2	13 Fev.

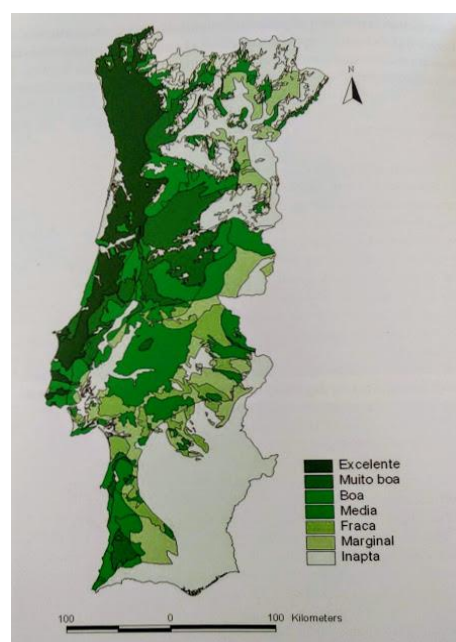
<sup>1</sup> Onda de frio: Do ponto de vista climatológico, considera-se uma onda de frio quando num intervalo de pelo menos 6 dias consecutivos, a temperatura mínima do ar é inferior em 5 °C ao valor médio diário da temperatura mínima, no período de referência de 1961-1990 (IPMA).

Verifica-se por observação da Figura 1 que no mês de fevereiro de 2012, a ocorrência das temperaturas mínimas médias mais baixas e inferiores a 0 °C acompanhou uma parte considerável do território com aptidão excelente a média para a plantação de eucalipto (Figura 2), com zonas na região centro em que se registaram temperaturas inferiores a -2 °C. É de salientar que apesar da informação útil que é possível extrair das temperaturas médias registadas numa região, principalmente se o objetivo for avaliar o potencial da área para plantações, os danos de frio mais consideráveis nas plantas são provocados essencialmente pelas temperaturas mínimas absolutas.

Assim, locais onde sejam frequentes episódios de temperaturas abaixo de -4 °C irão limitar à partida a implementação do eucalipto. No entanto, a ocorrência de ondas de frio ou diminuições súbitas da temperatura para valores abaixo da capacidade de sobrevivência das plantas, principalmente em áreas em que normalmente não se verifica problemas de frio e com uma área plantada significativa, pode provocar danos e mortalidade inesperada e ser uma causa de prejuízo para a indústria da celulose.



**Figura 1** – Distribuição da média das temperaturas mínimas registadas em fevereiro de 2012 em Portugal Continental (IPMA, 2012)



**Figura 2** – Distribuição da aptidão do eucalipto em Portugal Continental (Silva *et al*, 2007)

De um modo geral, as geadas são um fenómeno que consiste na ocorrência de uma temperatura do ar inferior a 0 °C, medido em abrigo meteorológico apropriado a uma altura de 1.5m. Em determinadas circunstâncias, a geada pode ser acompanhada pela formação de cristais de gelo sobre a superfície de corpos arrefecidos, resultantes da

congelamento do orvalho ou da sublimação do vapor de água, formando-se uma camada branca de gelo – geada branca (Melo-Abreu *et al.*, 2000). Por outro lado, a temperatura pode cair abaixo dos 0 °C e não ocorrer formação de gelo – o ponto de orvalho é mais baixo que a temperatura negativa nefasta atingida pelos órgãos vegetais, não se formando gelo. O arrefecimento é mais pronunciado em relação à geada branca, porque ao não ser atingido o ponto de orvalho, não ocorre libertação dos calores latentes de vaporização e fusão. Os tecidos vegetais apresentam um aspeto necrótico e enegrecido devido aos danos e consequente morte dos tecidos, por conseguinte este fenómeno é designado por geada negra (Melo-Abreu & Ribeiro, 2010).

A geada branca causa normalmente menos danos em relação à geada negra devido à libertação de calor durante a deposição de gelo (Snyder *et al.*, 2005). Não atingido o limite de resistência das plantas, não é imperativo que ocorram danos após uma geada branca. No entanto, quando transposto esse limite, este fenómeno pode causar danos suficientes que levem também ao aparecimento de necroses (Melo-Abreu *et al.*, 2000).

O potencial de ocorrência de danos causados pela geada depende em parte das condições do local em causa, assim a escolha da localização da plantação deve atender ao tipo de geada predominante na zona. Segundo Snyder *et al.* (1987), devem ser no geral evitadas plantações em depressões do terreno devido à acumulação de ar frio, além de no topo de montanhas ou colinas, em que o ar é também normalmente frio.

Quanto à época de ocorrência, as geadas podem surgir em qualquer estação do ano - na primavera, as geadas primaveris; no verão, as estivais; no outono as outonais e no inverno, as invernais. Apesar da dificuldade de prever os danos provocados, são normalmente as geadas tardias de primavera e as precoces de outono as mais prejudiciais, mesmo considerando espécies com menor sensibilidade ao frio ou mais adaptadas (Melo-Abreu, 1985).

Apesar do clima ameno que caracteriza Portugal, os cenários climáticos referentes às alterações climáticas prevêm o aumento significativo da temperatura média por todo o país até ao final do séc. XXI (APA, 2013). Com a previsão de que o número de dias de tempo frio e de geada têm tendência a diminuir, o risco para o eucalipto pela sua sensibilidade ao frio, surge precisamente na ocorrência súbita de fenómenos de temperaturas negativas abaixo do seu limite de sobrevivência. Sem o tempo necessário para a aclimação, o crescimento e produtividade do eucalipto são influenciados



negativamente, considerando que a descida de 0.5 – 1°C por vezes é suficiente para causar a mortalidade da planta (Almeida, 1993).

#### **1.4 As baixas temperaturas como condicionantes da produtividade**

A produtividade – produção de biomassa por unidade de área e por unidade de tempo, em  $\text{Mg ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$  ou  $\text{kg m}^{-2} \text{ano}^{-1}$  (Soares *et al.*, 2007) – depende fortemente da capacidade de um indivíduo capturar os recursos ambientais (água, radiação solar e nutrientes) e de os utilizar eficazmente na fixação de  $\text{CO}_2$  atmosférico em biomassa. Um determinado genótipo pode assim ter uma produção de lenho superior pela sua maior capacidade em obter os recursos disponíveis no local, por ser mais eficiente no uso desses recursos, e por ter a capacidade de alocar uma maior proporção de biomassa para a formação de lenho. De uma forma geral, a produção de biomassa lenhosa depende do balanço de carbono da planta, isto é, a diferença entre o carbono assimilado e o carbono que é gasto na respiração, síntese e manutenção dos tecidos da planta (Binkley *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2007).

A produtividade é condicionada pela acumulação de acontecimentos ao longo da vida da árvore, dependendo quer da eficiência na produção em períodos de abundância de recursos, quer da tolerância/sobrevivência a períodos de *stress* (Borrallho *et al.*, 2007). Assim, a produtividade de uma plantação é também influenciada pelas condições do meio em que se insere (Soares *et al.*, 2007), e além da fertilidade do solo, podem distinguir-se os níveis de precipitação e a temperatura como sendo das características do clima que mais limitam a produtividade do eucalipto, causando *stress* por seca e pelo frio (Teulières *et al.*, 2007).

De acordo com o grau de suscetibilidade da espécie e do genótipo a temperaturas negativas, o frio é um dos fatores que além de afetar a distribuição e a viabilidade das plantações de eucalipto, pode influenciar também o vigor e a sobrevivência das plantas, principalmente em idades jovens, mais sensíveis às baixas temperaturas (Costa e Silva *et al.*, 2007; Melo-Abreu & Ribeiro, 2010).

Apesar do *E. globulus* ser particularmente pouco resistente a baixas temperaturas (Marques *et al.*, 2012) os autores Battaglia *et al.* (1998) mostraram que mesmo uma temperatura abaixo do ótimo (13-14°C), implica uma redução do índice de área foliar e consequentemente um substancial decréscimo na produtividade, independentemente das possíveis diferentes respostas entre espécies do género. A relação entre a produtividade e as condições ambientais encontram-se bem documentadas (Soares *et*

*al.* 2007). Por exemplo, Tomé (1994) verificou que o número de dias de chuva, a precipitação total e o número de dias com geada eram as variáveis climáticas analisadas mais decisivas para a determinação da produção, obtendo-se uma correlação positiva significativa no caso das primeiras variáveis e negativa na segunda.

De uma forma geral, a temperatura influencia a produção lenhosa, na medida em que interfere nos processos fisiológicos que afetam o crescimento e o desenvolvimento do eucalipto (Almeida, 1993), implicando prejuízos para a indústria – menor volume por hectare e, conseqüentemente, o aumento dos custos de produção da madeira (Borrallho *et al.*, 2007).

### **1.5 Respostas das plantas às baixas temperaturas**

O eucalipto, por ser uma espécie perenifólia e por não exibir propriamente uma dormência durante o Inverno (tem a capacidade de reiniciar o crescimento dos ramos após pequenos intervalos de tempo com temperaturas mais amenas), caso não existam fatores limitantes mantém o seu crescimento durante todo o ano, deixando-o exposto a danos de frio (Ameida, 1993; Teulière *et al.*, 2007).

Os danos causados pelo frio numa espécie são frequentes no limiar das suas zonas ótimas de distribuição, durante invernos com temperaturas particularmente baixas ou quando ocorrem variações repentinas de temperatura, que podem levar ao enfraquecimento da planta ou pôr em causa a sua sobrevivência (Melo-Abreu & Ribeiro, 2010).

A ocorrência de uma geada suficientemente forte para causar danos nas plantas é muitas vezes imprevisível. Dependendo da época em que sucede, da intensidade e duração da mesma, as plantas de uma mesma espécie podem apresentar diferente sensibilidade às baixas temperaturas, de acordo com o seu estado de maturidade, atividade e aclimação (Almeida, 1993).

#### **1.5.1. Processo de congelamento**

A capacidade de uma planta crescer e se desenvolver de um modo óptimo está de acordo com um intervalo de temperatura bem definido, observando-se gradualmente sintomas de danos com o afastamento progressivo dos valores óptimos. Assim, os limites de sobrevivência são definidos pelas temperaturas extremas máxima e mínima nas quais a planta em consideração poderá sobreviver (Almeida, 1993). Refere-se também a existência de dois tipos de *stress* como resposta ao efeito das baixas

temperaturas: o *stress* causado por temperaturas entre 12°C e 0°C, isto é, abaixo da temperatura ótima de crescimento da espécie, mas não sendo baixa o suficiente para a formação de gelo; e o *stress* causado pelo congelamento (abaixo de 0°C) (Levitt, 1980; Chinnusamy *et al.*, 2010). Apesar de não se identificarem danos acima dos 0°C (danos por resfriamento) nos diversos estudos sobre o frio ao género *Eucalyptus*, diversos autores têm realizado trabalhos sobre os danos resultantes do congelamento (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1989; Valentini *et al.*, 1990; Costa e Silva *et al.*, 2009; Leslie *et al.*, 2014). A medida em que uma planta é danificada pela exposição a baixas temperaturas depende de diversos fatores, como o estado de desenvolvimento, a duração e severidade da geada, a capacidade de aclimação e se a formação do gelo ocorre nos espaços intra ou extra celulares.

Apesar da água pura gelar a 0 °C, as soluções celulares apresentam uma concentração variável de solutos orgânicos e inorgânicos dissolvidos, pelo que os seus pontos de fusão são inferiores a 0 °C. Por sua vez, a sobrefusão é um fenómeno que induz a que o congelamento dos tecidos não ocorra acima dos -1.5 °C. No entanto, caso a temperatura continue a descer, dá-se o início da congelação das soluções extracelulares – estas com um potencial osmótico menos negativo –, e a acumulação de gelo nos espaços intercelulares pode resultar na rutura das células e tecidos. Em resposta à diferença de potencial químico entre a água na solução intracelular e na extracelular (parcialmente congelada), ocorre a libertação de água para o meio intercelular, o que pode provocar a desidratação dos protoplastos e induzir danos irreversíveis (Thomashow, 1998; Melo-Abreu & Ribeiro, 2010). De facto, diversos autores reportam que os danos provocados pelo frio se verificam mais proeminentemente abaixo da temperatura a que o gelo se forma nos espaços intercelulares, e relacionam a morte das células com a desidratação (Levitt, 1980; Steponkus & Webb, 1992). Nomeadamente, se a perda de água for significativa, pode ocorrer rotura das membranas celulares e o grau de desidratação do protoplasma ser superior ao limiar de resistência das células, conduzindo à morte celular.

Por outro lado, segundo Melo-Abreu *et al.* (2010), o congelamento intracelular ocorre raramente na natureza, e existindo, a sua ação deve limitar-se a condições específicas como taxas de descida de temperatura acentuadas, sobrefusão elevada e em tecidos de plantas mais sensíveis. Este fenómeno não ocorre normalmente de forma espontânea, a não ser que se verifique sobrefusão das células até pelo menos aos -10°C. Nestas condições, o rápido aumento da massa de cristais de gelo pode ocorrer no interior da célula, no protoplasma, ou mesmo resultar da penetração do gelo exterior,

provocando a destruição mecânica das membranas e consequentemente, a morte das células (Almeida, 1993; Melo-Abreu & Ribeiro, 2010).

### **1.5.2. Efeitos do congelamento e mecanismos de defesa das plantas**

A realização das plantações de eucalipto no fim do Inverno e princípio da Primavera têm a vantagem de permitir que o crescimento inicial das plantas coincida com uma maior disponibilidade de água no solo, o que permite o desenvolvimento e colonização do sistema radicular no solo antes do início das condições estivais de déficit hídrico. Em contrapartida, esta é uma época em que a ocorrência ocasional de geadas pode causar danos consideráveis nas plantas, acrescido ao facto de plantas jovens de eucalipto (e tecidos meristemáticos) serem mais sensíveis ao frio que as plantas adultas (Thomashow, 1998; Costa e Silva *et al.*, 2009). Assim, valores de temperatura abaixo do limiar de resistência dos tecidos ao congelamento tendem a causar danos nas células, e consequentemente, verificam-se reduções no crescimento, na eficiência fotossintética e na capacidade de absorção e transporte de água pelas raízes (Leslie *et al.*, 2014).

Os danos nos tecidos foliares causados pela rutura de células pode implicar a redução das taxas fotossintéticas das plantas, devido principalmente a dois fatores: ao efeito do fenómeno de fotoinibição da fotossíntese (incapacidade de utilização da luz incidente), que diminui a eficiência do fotossistema II pela combinação de baixas temperaturas com altos níveis de radiação solar (Close & Beadle, 2003); e à limitação da atividade das enzimas do ciclo de Calvin. Por sua vez, temperaturas do solo mais baixas, tendem a aumentar a resistência ao fluxo de água através das raízes, ao reduzirem a condutividade hidráulica. Uma menor disponibilidade de água pode conduzir à redução nas taxas de transpiração e de fotossíntese, afetando o crescimento da planta (Wan *et al.*, 2001).

Quando expostas ao frio, as plantas podem desencadear três tipos principais de respostas: alterações na organização espacial e nas propriedades biofísicas das membranas celulares (modificações na fluidez das membranas celulares); abrandamento das reações químicas e bioquímicas; e sob condições de congelamento, alterações no estado e disponibilidade da água (Sakai *et al.*, 1987). De uma forma geral, as concentrações de determinados metabolitos (incluindo açúcares e proteínas protetoras) são alteradas, ocorrendo também modificações ao nível das membranas celulares, da expressão génica, bem como a nível hormonal (Zhu *et al.*, 2007; Ruelland *et al.*, 2009). Além disto, as baixas temperaturas (especialmente em combinação com

altos níveis de radiação) induzem um ligeiro stress oxidativo, o que gera e acumula espécies reativas de oxigénio (ROS), podendo causar danos oxidativos às proteínas, DNA e lípidos (Apel & Hirt, 2004; Chen *et al.*, 2014).

Quando os organismos vegetais são sujeitos a tensões originadas por componentes ambientais, neste caso a temperatura, podem ocorrer ajustamentos genotípicos a um regime de temperaturas prevalecente, surgindo ao longo de gerações – processo de adaptação. Em contrapartida, quando as alterações de temperatura são sazonais ou temporárias, são induzidos ajustamentos fenotípicos, num processo de aclimação (Almeida, 1993).

A aclimação ao frio é um processo pelo qual as plantas adquirem tolerância ao congelamento por exposição prévia a temperaturas baixas, acima do ponto de congelação (Chinnusamy *et al.*, 2007; Navarrete-Campos *et al.*, 2013). A aclimação provoca o abaixamento da temperatura mínima causadora de danos às folhas, aumentando desta forma o período de crescimento e permitindo assim uma maior produtividade das plantas aclimatadas em relação às não-aclimatadas. Almeida *et al.* (1994), num estudo em que se avaliou a resistência às baixas temperaturas e a capacidade de aclimação de diversas famílias de *E. globulus* puro e de híbridos da espécie, apuraram um aumento da resistência ao frio nos lotes aclimatados em todos os genótipos estudados, com uma gama de variação de até -3.4 °C mais tolerante, verificada numa família de *E. viminalis* x *E. globulus* (-6 °C para -9.4 °C com aclimação).

A capacidade de uma planta de uma determinada espécie aclimatar, depende da sua idade ou estado de desenvolvimento, do seu património genético, e por este ser um processo lento, da exposição a temperaturas noturnas entre 0 °C a 4 °C durante um período de tempo de vários dias a semanas (Tibbits & Reid, 1987; Almeida, 1993). Mesmo para plantas mais tolerantes, temperaturas negativas próximas de 0 °C podem causar danos num estado não aclimatado. Assim, a velocidade de aclimação é fundamental para a sobrevivência da planta, independentemente do respetivo nível de tolerância (Costa e Silva *et al.*, 2009).

Por sua vez, as plantas podem demonstrar também tolerância ao congelamento. A capacidade de tolerar o congelamento pode ser compreendida como a temperatura mínima, abaixo do ponto de congelamento, à qual uma planta pode ser exposta, sem sofrer danos (Duryea & McClain, 1983). É frequentemente expressa através da TL<sub>50</sub>,

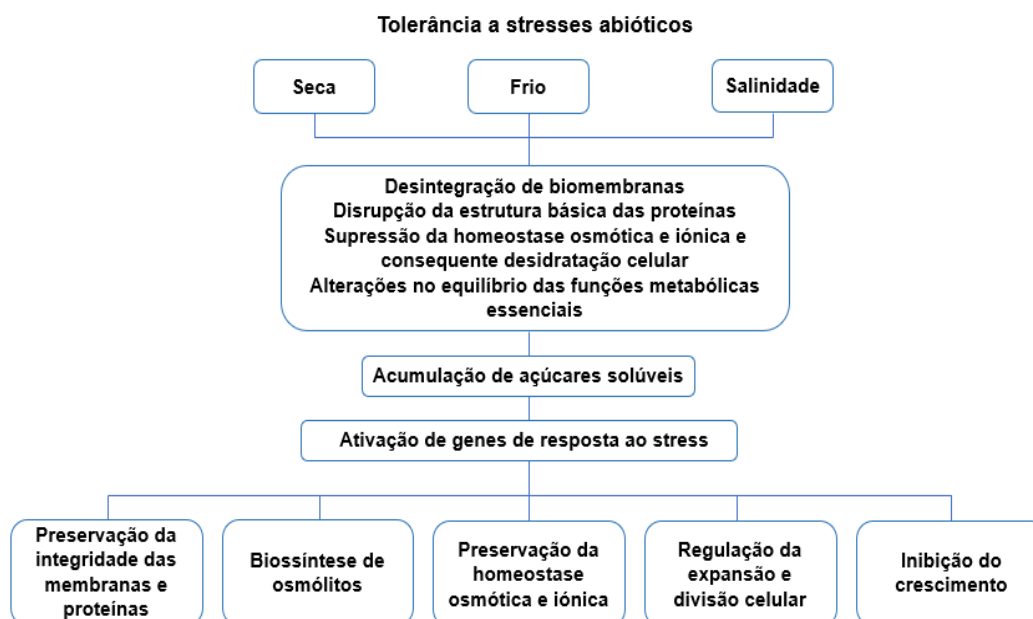
que identifica a temperatura a que corresponde um grau crítico de dano foliar de 50% (Tibbits *et al.*, 2006).

A resistência das plantas ao congelamento é resultado da capacidade do protoplasma em tolerar as tensões exercidas pela formação de gelo nos tecidos vegetais e da eficácia dos mecanismos que o evitam, atrasando ou impedindo o equilíbrio termodinâmico entre as células e o gelo extracelular (Burke *et al.*, 1976; Melo-Abreu & Ribeiro, 2010). A tolerância tende a aumentar com o processo de aclimação (Almeida *et al.*, 1994; Costa e Silva *et al.* 2009), no entanto as plantas desenvolveram mecanismos que lhes permitem evitar e/ou tolerar as baixas temperaturas, minimizando os danos da congelação e fomentando a sobrevivência.

As lesões provocadas pelas baixas temperaturas ocorrem com a formação de gelo na parte interna dos tecidos vegetais danificando as células da planta. Após a congelação dos tecidos, o grau de tolerância pode ser definido pela diferença entre a temperatura a que se inicia a congelação e a temperatura a que os danos se iniciam, sendo referido que as lesões resultantes do congelamento em tecidos vegetais tolerantes, surgem a uma temperatura mais baixa do que a temperatura a que se forma o gelo (Larcher, 1982). Os principais mecanismos que permitem tolerar a congelação, têm assim como base impedir ou reduzir a formação de cristais de gelo no meio extracelular, nomeadamente: por dessecação das células (a acumulação de matéria seca e diminuição da humidade, levam à ausência de água congelável e das células), por abaixamento do ponto de congelamento (devido à pressão osmótica criada pela desidratação e pela presença de solutos em maior concentração na solução celular), por sobrefusão (permite manter o estado líquido abaixo do ponto de congelação da solução) e pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática, para evitar o congelamento intracelular (manter a congelação extracelular em equilíbrio evita que o ponto de congelação do protoplasma seja atingido) (Snyder & Melo-Abreu, 2005; Melo-Abreu & Ribeiro, 2010). Por sua vez, a formação do gelo extracelular permite evitar o congelamento intracelular, nomeadamente por conduzir à remoção de água do interior da célula, à libertação de calor resultante e pela proteção que representa contra um maior arrefecimento (Almeida, 1993).

A capacidade de resposta ao frio por parte das plantas está também relacionada com o seu estado fisiológico. Tem sido registado que o aumento da tolerância a stresses abióticos, como o frio, é frequentemente acompanhado pela acumulação de açúcares solúveis (Figura 3) durante o processo de aclimação da planta, sendo estes solutos

referidos como crioprotetores das estruturas celulares (Almeida *et al.*, 1994; Leborgne *et al.*, 1995; Costa e Silva *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2009; Theocharis *et al.*, 2012; Sami *et al.*, 2016).



**Figura 3** - Diagrama com representação esquemática do papel desempenhado pelos açúcares solúveis sob diversos stresses abióticos. Adaptado de Sami *et al.*, 2016.

### 1.6. Enquadramento e objetivos do estudo

O presente estudo foi realizado em parceria com a Altri, empresa de referência na produção de pastas de eucalipto para papel, com a gestão de cerca de 80 mil hectares de floresta certificada. Dispondo de um vasto conjunto de híbridos de *Eucalyptus* spp. jovens, resultantes de propagação vegetativa de germinantes, com vários cruzamentos e retrocruzamentos e agrupados em cerca de 50 famílias, a Altri pretende selecionar a partir deste material possíveis candidatos para florestação em zonas suscetíveis de seca, ocorrência de geadas e com risco de ataque de *Gonipterus platensis*.

Este trabalho pretendeu efetuar um estudo preliminar de avaliação da tolerância a baixas temperaturas de um número inicial restrito de genótipos de *Eucalyptus* spp. do conjunto de híbridos produzidos pela Altri, com o propósito final de selecionar os melhores cruzamentos para integrar a população de infusão no ciclo de melhoramento desta empresa. Foram selecionados seis clones para este estudo, dos quais um clone puro de *E. globulus* e cinco híbridos de *E. globulus*. Numa primeira fase, com plantas em condições de viveiro e sem aclimação, realizaram-se testes de frio em condições controladas, para se obter um *ranking* de tolerância ao frio dos diferentes híbridos. Neste

estudo preliminar, o principal objetivo foi assim identificar os clones com menores danos, quando sujeitos a um abaixamento da temperatura, sem período de aclimação ao frio.

Para complementar os resultados obtidos com o material vegetal de viveiro, realizou-se também a avaliação da tolerância ao frio das mesmas famílias em condições de campo, para comparação com a hierarquia de tolerância ao frio em condições de viveiro.

De forma a determinar a tolerância ao frio, estimou-se a temperatura a que corresponde 50% de mortalidade das plantas ( $TL_{50}$ ) com base no método da condutividade elétrica, uma metodologia desenvolvida por Dexter *et al.* (1930).

Para caracterizar o material vegetal utilizado e para se investigarem possíveis relações entre a tolerância ao frio das plantas e o seu estado fisiológico, foram medidos diferentes parâmetros morfológicos (altura, diâmetro e área foliar específica - SLA) e bioquímicos (concentração em açúcares solúveis e clorofilas) nos rametos amostrados.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material Vegetal**

#### **2.1.1 Material vegetal de viveiro**

As plantas utilizadas neste estudo foram produzidas pelos viveiros do grupo ALTRI (Viveiro do Furadouro, Leiria). Todas as plantas resultaram de propagação vegetativa (clones) e foram produzidas ao longo do ano de 2017, tendo no máximo um ano na altura dos testes de frio. Foram selecionados seis rametos de seis diferentes grupos de clones, um de *E. globulus* e cinco representando híbridos de *E. globulus* com outros *Eucalyptus* spp., (Quadro 2). Os clones YG15 e AC-58 pertencem à população de produção da ALTRI, sendo o primeiro identificado como mais tolerante ao frio em relação ao segundo com base nos resultados observados nas plantações de campo. Os quatro clones dos restantes híbridos (Hib 1A, Hib 1B, Hib 2 e Hib 3) representam material vegetal da população de melhoramento da empresa. Saliente-se que os clones Hib 1A e Hib 1B são irmãos completos provenientes da mesma família do híbrido *E. globulus* x *E. nitens*.

As plantas foram transportadas do viveiro do Furadouro em contentores de 40 alvéolos de 45 mm de diâmetro e volume de 120 cm<sup>3</sup> para os viveiros do ISA no mês de janeiro de 2018, e transplantadas para contentores de 20 alvéolos de 72 x 72 mm e volume de 800 cm<sup>3</sup>.



**Quadro 2.** Identificação do material clonal selecionado para as condições de viveiro e respetivos progenitores masculinos e femininos.

ID	Progenitor		Nº Rametos
	♀	♂	
<b>AC58</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. globulus</i>	6
<b>YG15</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. cypellocarpa</i>	6
<b>Hib 1A</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. nitens</i>	6
<b>Hib 1B</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. nitens</i>	6
<b>Hib 2</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. dunnii</i>	6
<b>Hib 3</b>	<i>E. viminalis</i> x <i>E. globulus</i>	<i>E. dunnii</i>	6

Para o envasamento utilizou-se um substrato, composto por uma mistura de húmus à base de resíduos florestais, turfa-loira e casca de pinho marítimo (Siro Strat Melhorado, SIRO), numa proporção de 2:1:1 (Figura 4).

#### Características Químicas

Azoto (N) total	070 - 150 mg/l
Fósforo (p <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	070 - 300 mg/l
Potássio (K <sub>2</sub> O)	200 - 400 mg/l

**Condutividade:** 40 - 100 µS/cm

**pH em CaCl<sub>2</sub>:** 5.5-6.5

**MO** > 70 %

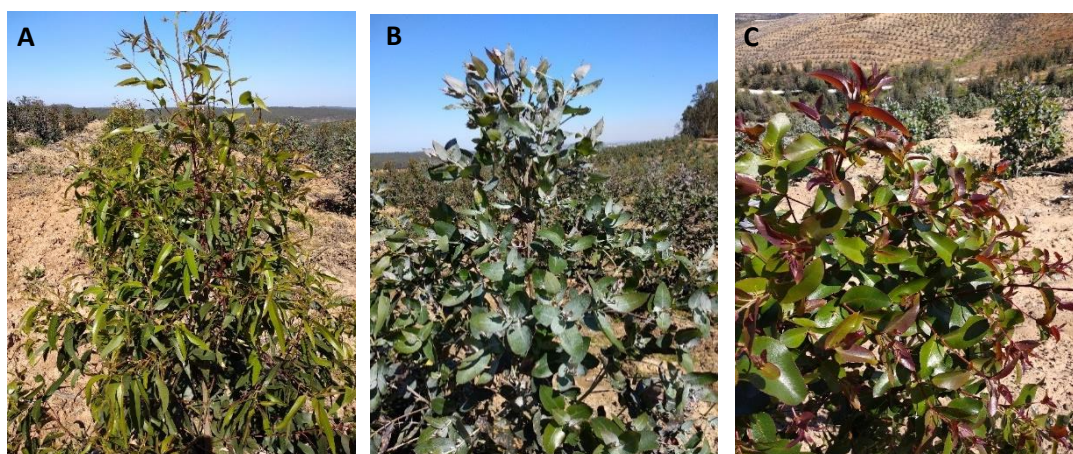
**Figura 4** – Características do substrato utilizado na transplantação dos eucaliptos (Siro Strat Melhorado)

Até ao mês de março as plantas foram mantidas no exterior com duas a três regas semanais, registando-se nesse período uma temperatura média máxima de 20.8±1.2 °C (média ± erro padrão) e uma temperatura média mínima de 8.9 ± 0.3 °C – temperatura máxima e mínima absolutas: 36 °C e 4 °C, respetivamente. Durante o período de testes de frio, de 14 de março a 20 de abril, o material foi mantido numa estufa no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (Quinta do Marquês, Oeiras). Neste período, a temperatura média máxima foi de 24.4±0.7 °C e a temperatura média mínima de 8.4±0.9 °C – temperatura máxima e mínima absolutas: 28 °C e 6 °C, respetivamente.

#### 2.1.2. Material vegetal de campo

Num ensaio experimental de campo da ALTRI, na área florestal da Quinta do Furadouro, foram recolhidas amostras de plantas em março de 2018 (Figura 5). Amostraram-se ramos inteiros com folhas completamente expandidas de plantas com cerca de 1 ano após plantação das cinco famílias clonais (Quadro 2). Por falta de representação no

ensaio de campo, os Hib 1A e Hib 1B foram agrupados como representativos da mesma família, por serem irmãos completos (Hib 1). Também pela falta de representatividade no campo não foi possível recolher amostras em 6 rametos de 3 clones em estudo (Hib 1, Hib 2 e Hib 3). Assim, de forma a que se obtivessem 6 indivíduos por clone, nestes casos foram considerados e colhidos rametos provenientes de irmãos completos desses clones (Quadro 3).



**Figura 5** – Clones amostrados no ensaio de campo no Furadouro ilustrando as diferenças morfológicas e a influência dos progenitores. A – Clone YG15; B – clone AC-58; C – Clone Hib 3

**Quadro 3.** Identificação do material clonal amostrado no ensaio de campo por grupos de clones/famílias consideradas.

ID	Progenitor		Nº Rametos
	♀	♂	
<b>AC-58</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. globulus</i>	6
<b>YG15</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. cypelloarpa</i>	6
<b>Hib 1</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. nitens</i>	6
<b>Hib 2</b>	<i>E. globulus</i>	<i>E. dunni</i>	6
<b>Hib 3</b>	<i>E. viminalis</i> x <i>E. globulus</i>	<i>E. dunni</i>	6

O transporte dos ramos para o laboratório foi efetuado individualmente em sacos de plástico identificados, numa geleira térmica com acumuladores de frio. O material vegetal foi mantido no frio a 7 – 8 °C para no dia seguinte se realizarem os testes de frio.

## **2.2. Testes de frio e quantificação dos danos foliares**

### **2.2.1. Testes de frio**

Os testes de frio foram realizados em folhas destacadas dos rametos dos clones selecionados, aceitando-se que existe uma boa correlação entre os danos por frio numa folha e na planta inteira (Almeida, 1993).

Para cada teste de frio realizado recolheu-se uma folha totalmente expandida (entre o 2º e o 4º patamar de inserção) de cada um de seis rametos por clone do material vegetal de viveiro (Quadro 2). Adicionalmente, recolheu-se uma folha de cada rameto, para ser usada como controlo e comparada com as folhas sujeitas ao tratamento de frio (folhas controle). Assim que destacadas, as folhas foram envolvidas em papel de alumínio para evitar perdas de água e estarem sujeitas a flutuações de temperatura e colocadas numa bolsa de polietileno transparente selada e identificada.

As folhas foram submetidas a testes de frio com temperaturas negativas, através de um banho-maria refrigerado, com circulação fechada de líquidos (RM6, Lauda), no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Para cada tratamento realizado, o banho foi programado para uma temperatura-alvo definida, mantendo o banho a uma temperatura constante. Para evitar o congelamento do líquido, foi adicionado um anticongelante. Quando atingida na câmara a temperatura definida, as folhas foram imersas no banho de forma aleatória permanecendo durante 2 horas. Durante este período, as folhas controlo foram mantidas a uma temperatura ambiente regulada para 20 °C. A monitorização da temperatura na câmara foi feita com 11 termopares ligados a um sistema automático de aquisição e armazenamento de dados com registos em cada minuto (DL2, Delta-T Devices). Os termopares foram colocados de forma aleatória junto das folhas nas bolsas de polietileno.

Para aferição e otimização do método foi realizado um primeiro teste de frio à temperatura de  $-3.8 \pm 0.02$  °C, no dia 7 de março de 2018. Posteriormente, realizaram-se 3 testes de frio às temperaturas de  $-5.0 \pm 0.01$ ,  $-3.1 \pm 0.01$  e  $-4.1 \pm 0.02$  °C, a 14 de março, 2 de abril e 18 de abril, respetivamente. O teste com as folhas controlo foi realizado no dia 14 de março.

No material vegetal proveniente do ensaio de campo avaliou-se a resposta ao frio de folhas em estágios de desenvolvimento diferentes: folhas jovens terminais ainda em expansão (mais sensíveis às baixas temperaturas) e folhas totalmente expandidas. Com base nos resultados dos testes de frio para o material vegetal de viveiro, as folhas foram

sujeitas a um único teste de frio à temperatura de  $4.5 \pm 0.01$  °C no dia 21 de março. Igualmente, foi recolhida uma folha de cada rameto de cada clone para ser usada como controlo ao teste de frio.

### 2.2.2. Quantificação dos danos foliares

Os danos causados pelas baixas temperaturas nos tecidos foliares foram avaliados pelo método da condutividade elétrica, desenvolvido por Dexter *et al.* (1930) e aferido em diversos estudos de frio em *Eucalyptus spp.* (Raymond *et al.*, 1986; Almeida *et al.*, 1994; Moraga *et al.*, 2006; Costa e Silva *et al.*, 2009; Coopman *et al.*, 2010). Esta metodologia baseia-se no facto de as baixas temperaturas provocarem lesões nas membranas celulares que conduzem a um efluxo de eletrólitos das células proporcional a essas lesões. De uma forma geral, este método permite estimar a temperatura que causa 50% de mortalidade das amostras submetidas às baixas temperaturas ( $TL_{50}$ )

Ao fim das 2 horas do tratamento de frio, foi retirada uma amostra de 3 discos de 1 cm de diâmetro por folha e colocados em tubos de ensaio com 15 ml de água desionizada. Após um período de 24 horas à temperatura ambiente (ca. 20 °C) foi feita uma primeira medição da condutividade elétrica da solução ( $T_1$ ) com um condutivímetro (Crison, GLP 30). Em seguida, as amostras foram colocadas numa estufa durante 2h a 95 °C para destruição total das membranas celulares. Após um novo período de 16 horas à temperatura ambiente, foi lida a condutividade elétrica ( $T_2$ ) correspondendo ao total de eletrólitos libertados das células para a solução.

Os danos pelo frio nos tecidos foliares foram determinados pela expressão de Danos Relativos (*Relative Injury* – RI):

$$RI (\%) = (T_1/T_2) \times 100,$$

onde  $T_1$  corresponde à condutividade elétrica medida 24 horas após o teste de frio e  $T_2$  à condutividade elétrica máxima após a destruição das membranas celulares.

Para estimar a temperatura que causa a mortalidade de 50% da população ( $TL_{50}$ ), foi determinada a temperatura correspondente a um valor de RI de 50%, admitindo-se que este valor estabelece o limite entre a sobrevivência e a morte da planta. Em Almeida (1993) foi demonstrado que valores de RI superiores a 50% são indicativos da mortalidade das plantas amostradas. Tendo sido testadas 3 temperaturas negativas

para o material vegetal de viveiro, com resultados de RI inferiores e superiores a 50%, foi possível estimar a  $TL_{50}$  para cada clone através de uma interpolação linear.

## **2.3. Caracterização morfológica e bioquímica**

### **2.3.1. Caracterização morfológica**

No início de abril foi medida a altura e o diâmetro nos 6 rametos de cada um dos clones de viveiro. A medição da altura foi determinada entre o colo da planta e a extremidade do gomo apical do eixo principal. Para o diâmetro, utilizou-se uma craveira digital determinando-se os diâmetros cruzados do colo.

A determinação da área foliar específica (SLA) das plantas do viveiro decorreu na mesma data que o teste de frio a  $-3.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2 de abril) e para o material vegetal do ensaio de campo na data do teste de frio correspondente (21 de março). A SLA foi calculada para uma amostra de discos foliares de cada planta pela razão entre a área dos discos e o seu peso seco. Foi recolhida uma amostra de 3 discos foliares de 1 cm de diâmetro de folhas no mesmo estado de desenvolvimento das utilizadas para os testes de frio. O peso seco das amostras foi determinado numa balança de precisão (ME104, Mettler Toledo) após secagem numa estufa a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48h.

### **2.3.2. Caracterização bioquímica**

Em simultâneo com a recolha de amostras para a determinação da SLA foi recolhida uma amostra para a determinação dos açúcares solúveis (não estruturais) e do teor de clorofilas. Foram extraídos 3 discos foliares por folha e colocados em eppendorf's identificados e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A determinação dos açúcares solúveis e do teor de clorofilas foi realizada em maio e junho no laboratório de Ecofisiologia Florestal do Instituto Superior de Agronomia.

### **Quantificação dos açúcares solúveis**

Os açúcares solúveis – glucose, frutose e sacarose – foram determinados por métodos enzimáticos descritos por Jones *et al.* (1977) e Stitt *et al.* (1978, 1989), baseados na hidrólise da sacarose e posterior redução do  $\text{NADP}^+$  numa série de reações enzimáticas. O NADPH resultante destas reações é quantificado diretamente por espectrofotometria. As leituras no espectrofotómetro (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR) foram efetuadas a 340 nm, pico de absorvância do NADPH.

Para extração e separação da fração dos açúcares solúveis contidos na amostra vegetal, adicionou-se 15 ml de etanol a 80% (v/v) aos discos foliares num tubo de ensaio. Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 80 °C durante 20 minutos. Após um período de arrefecimento, descartaram-se os discos foliares, conservando-se apenas a solução. Extraiu-se posteriormente 1 ml do extrato alcoólico e colocou-se num eppendorf. As amostras foram guardadas em frigorífico até ser feita a quantificação dos açúcares.

A 20 µl do extrato alcoólico na cuvete do espectrofotómetro juntou-se 1100 µl de tampão imidazol HCl 100 mM (pH = 6.9), 40 µl de 1,1 mM ATP, 40 µl de 0,5 mM NADP<sup>+</sup> e 2 µl de 0,5 U Hexokinase, HK (EC 2.7.1.1). Após aguardar uns minutos para atuação da hexokinase e para que ocorresse a fosforilação, acrescentou-se sucessivamente, e à medida que era atingido um patamar, 2 µl de 2 U desidrogenase da glucose-6-fosfato, GDH (EC 1.1.1.49), 2 µl de 2 U fosfoglucoase isomerase, PGI (EC 5.3.1.9) e 4 µl de 20 U invertase (EC 3.2.1.26).

Para calcular as concentrações da glucose, frutose e sacarose, foi utilizada a fórmula:

$$m (\mu\text{mol cm}^{-2}) = (\Delta\text{abs}/\epsilon_M \times V_{tc}/V_{ac} \times V_e)/A$$

onde: m = glucose, frutose ou sacarose (no caso da sacarose o resultado deve ser dividido por 2);  $\Delta\text{abs}$  = variação da absorvância;  $\epsilon_M$  coeficiente de extinção molar do NADP ou NAD;  $V_{tc}$  = volume total na cuvete;  $V_{ac}$  = volume da amostra na cuvete; A = área foliar.

### **Quantificação do teor de clorofilas**

Para quantificação do teor de clorofilas, colocou-se na cuvete do espectrofotómetro 1 ml da solução com os discos foliares em etanol a 80% (v/v), após banho-maria a 80 °C e arrefecimento dos tubos de ensaio.

Segundo o método descrito em Arnon (1949) fizeram-se leituras da absorvância para os comprimentos de onda de máxima absorção das clorofilas *a* e *b* (663 e 645 nm, respetivamente) no espectrofotómetro (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR). O teor de clorofila total ( $\text{clof}_{\text{total}}$ ), clorofila *a* ( $\text{clof}_a$ ) e clorofila *b* ( $\text{clof}_b$ ) foi determinado recorrendo às fórmulas de cálculo (Arnon, 1949):

$$\text{Clob}_{\text{total}} (\text{g m}^{-2}) = [(0.0202 \times \text{abs}_{645} + 0.00802 \times \text{abs}_{663}) \times d \times 10]/s$$

$$\text{Clob}_a (\text{g m}^{-2}) = [(0.0127 \times \text{abs}_{663} - 0.00269 \times \text{abs}_{645}) \times d \times 10]/s$$

$$\text{Clob}_b (\text{g m}^{-2}) = [(0.0229 \times \text{abs}_{645} - 0.00468 \times \text{abs}_{663}) \times d \times 10]/s$$

onde:  $\text{abs}_{645}$  e  $\text{abs}_{663}$  = absorvância lida a 645 nm e 663 nm, respetivamente; d = volume final de extracto ( $\text{cm}^3$ ); s = área dos discos foliares ( $\text{cm}^2$ ); 10 = fator de conversão para  $\text{g m}^{-2}$ .

## 2.4. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados, recorreu-se ao software *SigmaPlot*® versão 13.0 (*Systat Software Inc.*). Para comparar os resultados entre as famílias de clones, e nomeadamente para a análise de variâncias, foram utilizados numa primeira fase os testes de *Shapiro-Wilk* e *Brown-Forsythe* para avaliar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respetivamente. Quando as variâncias apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA a um fator. Nos casos em que não se verificaram os pressupostos da normalidade e homogeneidade das variâncias, optou-se pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para isolar os grupos que diferiram entre si, devido a médias estatisticamente diferentes, utilizou-se o teste de *Tukey*. A existência de correlações foi analisada pela aplicação do coeficiente de *Pearson*. O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $\alpha = 0.05$ ). A estatística descritiva foi realizada com base em médias e erros padrão.

## 3. Resultados

### 3.1. Material vegetal de viveiro

#### 3.1.1. Alturas, diâmetros e área foliar específica

No Quadro 4 é caracterizado morfologicamente o material vegetal de viveiro. Apesar do Hib 3 ser o clone com o maior valor em altura, o mesmo não se reflete no diâmetro, com um valor baixo em relação aos restantes clones, e com um valor de área foliar específica (SLA) intermédio. O clone AC-58 mostrou ter em relação aos restantes os menores valores de altura, diâmetro e de área foliar específica (SLA). Por sua vez, os híbridos Hib 1A e Hib 2, apresentaram uma SLA superior ( $152.8 \pm 7.6$  e  $152.6 \pm 4.5 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ , respetivamente).

Pela correlação de Pearson, foi possível verificar uma relação positiva forte entre o diâmetro e a SLA ( $r = 0.80$ ), com as plantas mais delgadas a apresentarem folhas com menor área foliar específica.

**Quadro 4.** Altura, diâmetro e área foliar específica (SLA) dos clones do material vegetal de viveiro. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

ID	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	SLA (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
AC-58	53.1 $\pm$ 1.3 a	5.2 $\pm$ 0.2 a	107.7 $\pm$ 8.8 a
YG15	61.0 $\pm$ 0.7 ab	5.8 $\pm$ 0.3 ab	134.5 $\pm$ 7.4 ab
Hib 1A	55.3 $\pm$ 4.4 a	6.9 $\pm$ 0.5 b	152.8 $\pm$ 7.6 b
Hib 1B	58.5 $\pm$ 2.9 ab	5.9 $\pm$ 0.2 ab	145.9 $\pm$ 6.7 ab
Hib 2	59.9 $\pm$ 1.6 ab	5.9 $\pm$ 0.2 ab	152.6 $\pm$ 4.5 b
Hib 3	81.5 $\pm$ 4.2 b	5.8 $\pm$ 0.3 ab	131.0 $\pm$ 13.2 ab

### 3.1.2. Clorofilas

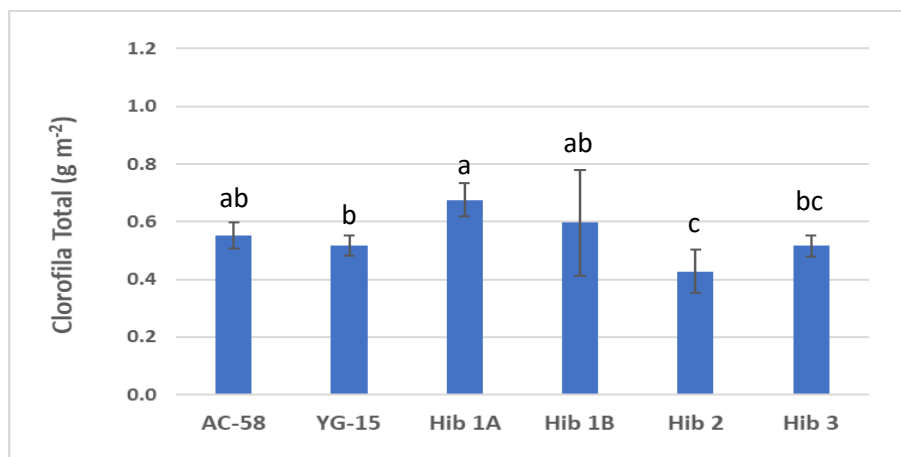
Analisando os teores de clorofila (Quadro 5), verifica-se que a clorofila *a* é o pigmento fotossintético em maiores concentrações para todos os clones de viveiro, com uma variação de 0.27 (Hib 2) a 0.45 g m<sup>-2</sup> (Hib 1A). Por sua vez, a clorofila *b* manteve-se entre 0.15 (Hib 2) e 0.22 g m<sup>-2</sup> (Hib 1B). Verificaram-se diferenças significativas entre os clones para a clorofila *a* ( $P < 0.001$ ), clorofila *b* ( $P = 0.005$ ) e para a razão entre a clorofila *a* e *b* ( $P = 0.031$ ).

**Quadro 5.** Concentrações de clorofila *a* e *b* (Cf<sub>a</sub> e Cf<sub>b</sub>) e razão entre clorofila *a* e *b* (Cf<sub>a/b</sub>) (g m<sup>-2</sup>) dos clones em condições de viveiro. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada com ANOVA a um fator (Clorofila *a* e *b*), teste de Kruskal-Wallis (Clorofila *a/b*) e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

ID	Clorofilas (g m <sup>-2</sup> )		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a/b</i>
AC-58	0.36 $\pm$ 0.02 ab	0.19 $\pm$ 0.01 ab	1.87 $\pm$ 0.05 a
YG15	0.34 $\pm$ 0.01 ab	0.18 $\pm$ 0.01 ab	1.88 $\pm$ 0.04 a
Hib 1A	0.45 $\pm$ 0.02 c	0.22 $\pm$ 0.01 b	2.07 $\pm$ 0.06 b
Hib 1B	0.38 $\pm$ 0.03 bc	0.22 $\pm$ 0.02 b	1.81 $\pm$ 0.18 a
Hib 2	0.27 $\pm$ 0.02 a	0.15 $\pm$ 0.01 a	1.78 $\pm$ 0.07 a
Hib 3	0.33 $\pm$ 0.02 ab	0.19 $\pm$ 0.01 ab	1.75 $\pm$ 0.04 a



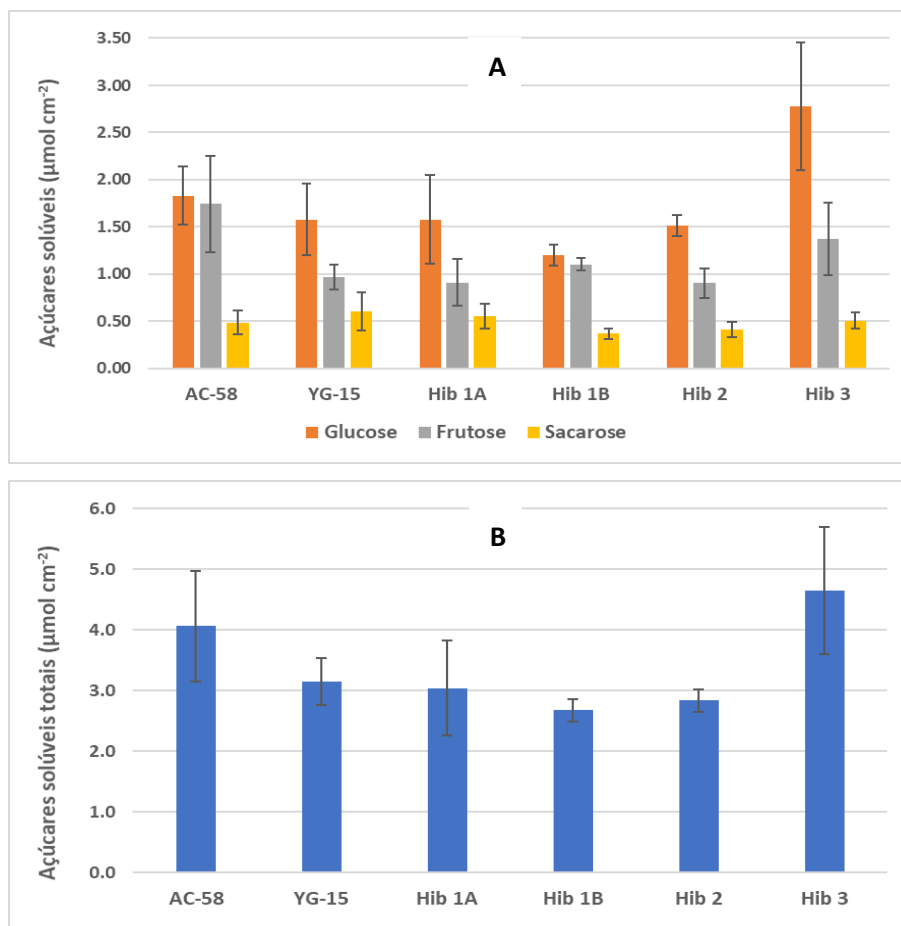
No caso da clorofila total, os valores mínimos e máximos obtidos mostraram a mesma tendência, com uma variação entre 0.43 e 0.68 g m<sup>-2</sup>. As médias entre os clones diferiram significativamente ( $P < 0.001$ ) (Figura 6).



**Figura 6** – Concentração de clorofila total (g m<sup>-2</sup>) nas folhas dos clones em condições de viveiro. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada com ANOVA a um fator e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.1.3. Açúcares Solúveis

Relativamente aos açúcares solúveis das folhas dos rametos de viveiro, a glucose é o componente em maior concentração em todos os clones, seguida da frutose e da sacarose (Figura 7A). Verifica-se ser o Hib 3 o clone com maior concentração em glucose ( $2.8 \pm 0.7 \mu\text{mol cm}^{-2}$ ) e o Hib 1B com menor ( $1.2 \pm 0.1 \mu\text{mol cm}^{-2}$ ). No caso da frutose esta varia entre 0.9 (Hib 2) e  $1.7 \mu\text{mol cm}^{-2}$  (AC-58). Para a sacarose, a variação ocorreu entre 0.4 (Hib 1B) e  $0.6 \mu\text{mol cm}^{-2}$  (YG15). Não se verificaram diferenças significativas entre os clones para os três componentes dos açúcares solúveis. Apesar de o híbrido Hib 3 ser o clone com maior concentração de açúcares solúveis totais ( $4.7 \pm 1.0 \mu\text{mol cm}^{-2}$ ) e o inverso para o Hib 1B ( $2.7 \pm 0.2 \mu\text{mol cm}^{-2}$ ), não se verificaram diferenças significativas (Figura 7B).



**Figura 7.** Concentração em: **A** - glucose, frutose e sacarose ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ); **B** – Açúcares solúveis totais ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ), nas folhas dos clones de viveiro. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

#### 3.1.4. Danos de frio

Para a determinação da tolerância ao frio dos clones em condições de viveiro, foram realizados 3 testes de frio às temperaturas de  $-3.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-4.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-5.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os danos relativos provocados nas membranas celulares pelas várias temperaturas testadas ( $RI\%$ ) foram calculados e estimada a  $TL_{50}$  para cada rameto, obtendo-se o valor médio para cada clone (Quadro 6).

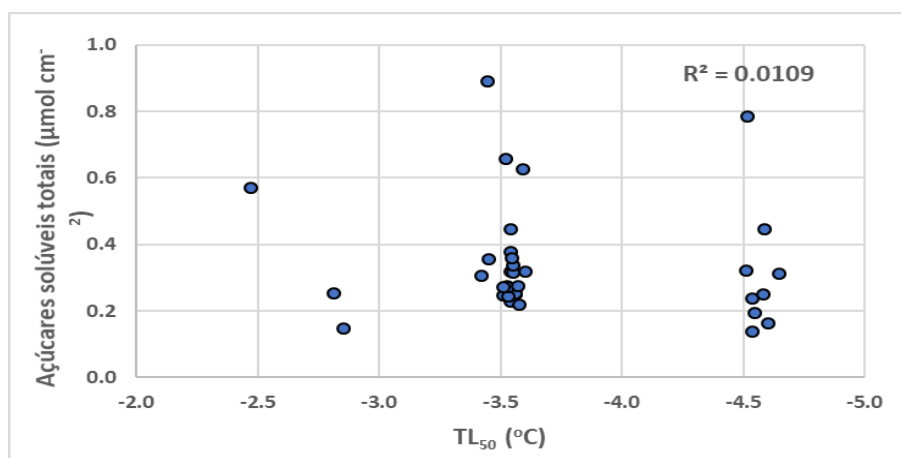
Pelos resultados de  $RI$  constata-se que à temperatura de  $-3.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  não houve mortalidade em nenhum clone, todos com valores abaixo dos 50% de danos. À temperatura de  $-4.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observaram-se  $RI$  superiores a 50 % para todos os híbridos, exceto o YG15, que se manteve no limiar dos 50 % de danos, e para o clone AC-58 de *E. globulus*, com 42.9 %. À temperatura mais baixa de  $-5.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , todos os clones mostraram danos superiores a 50%. Pela análise dos valores de  $TL_{50}$  verifica-se que a tolerância ao frio é muito

semelhante entre os clones, variando entre -3.4 e -4.1 °C (Quadro 6). Apesar de não se verificarem diferenças significativas entre os clones, é relevante destacar uma amplitude de 0.7 °C entre o mais tolerante (YG15, -4.1 ± 0.13 °C) e o mais sensível (Hib 1B, -3.4 ± 0.12 °C).

**Quadro 6** – Danos Relativos (*Relative Injury*, **RI**%) e estimativa do parâmetro TL<sub>50</sub> (°C) dos clones em condições de viveiro, com base nos testes de frio a -3.1 ± 0.01 °C, -4.1 ± 0.02 °C e -5.0 ± 0.01 °C. Os valores representam a média ± erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

ID	RI (%)			TL <sub>50</sub> (°C)
	-3.1 °C	-4.1 °C	-5.0 °C	
AC-58	30.3 ± 6.6	42.9 ± 12.8 ab	78.7 ± 0.8 a	-4.0 ± 0.4
YG15	21.0 ± 0.9	50.0 ± 13.8 a	73.7 ± 0.9 b	-4.1 ± 0.2
Hib 1A	27.6 ± 6.1	76.6 ± 11.2 b	68.1 ± 10.4 ab	-3.6 ± 0.2
Hib 1B	28.8 ± 5.7	83.2 ± 1.0 ab	75.4 ± 0.4 ab	-3.4 ± 0.1
Hib 2	30.0 ± 5.2	73.1 ± 9.7 ab	78.9 ± 0.7 a	-3.5 ± 0.03
Hib 3	24.1 ± 1.3	73.0 ± 10.8 ab	78.7 ± 0.9 a	-3.7 ± 0.2

Para cada rameto foi analisada a relação entre a TL<sub>50</sub> e os açúcares solúveis totais com a realização de uma correlação de Pearson. Verificou-se não haver correlação significativa (Figura 8). Igualmente, também não se verificou haver correlações significativas entre a TL<sub>50</sub> e a concentração em glucose, frutose ou sacarose.



**Figura 8** – Relação entre os açúcares solúveis totais (µmol cm<sup>-2</sup>) e o parâmetro TL<sub>50</sub> (°C) para cada rameto testado (n = 36).

### 3.2. Material vegetal de campo

#### 3.2.1. Área foliar específica

No material vegetal de campo, todos os clones apresentaram pequenas diferenças entre o SLA de folhas jovens e adultas (Quadro 7). O clone YG15 mostrou ter um SLA das folhas jovens significativamente inferior ao clone Hib 2 ( $79.3 \pm 1.9$  vs.  $100.9 \pm 4.6$ , respectivamente). Para as folhas adultas, os mesmos clones mostraram diferenças significativas. O clone Hib 3 apesar dos baixos valores de SLA em ambos os tipos de folhas, mostrou uma grande variabilidade entre rametos. Em geral, o SLA das folhas jovens nas plantas provenientes do campo variou entre  $77.4 \pm 10.6$  (Hib 3) e  $100.9 \pm 4.6$  (Hib 2). Nas folhas adultas o maior valor de SLA correspondeu também ao Hib 2 ( $101.0 \pm 5.3$ ) e o menor ao YG15 ( $68.2 \pm 4.9$ ).

**Quadro 7.** Área foliar específica, SLA ( $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$ ) de folhas novas e adultas amostradas no ensaio de campo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

ID	SLA ( $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$ )	
	Folhas jovens	Folhas adultas
AC-58	$83.6 \pm 1.7$ ab	$80.9 \pm 3.5$ ab
YG15	$79.3 \pm 1.9$ a	$68.2 \pm 4.9$ a
Hib 1	$94.1 \pm 4.8$ ab	$100.6 \pm 5.5$ ab
Hib 2	$100.9 \pm 4.6$ b	$101.0 \pm 5.3$ b
Hib 3	$77.4 \pm 10.6$ ab	$75.40 \pm 11.1$ ab

#### 3.2.2. Clorofilas

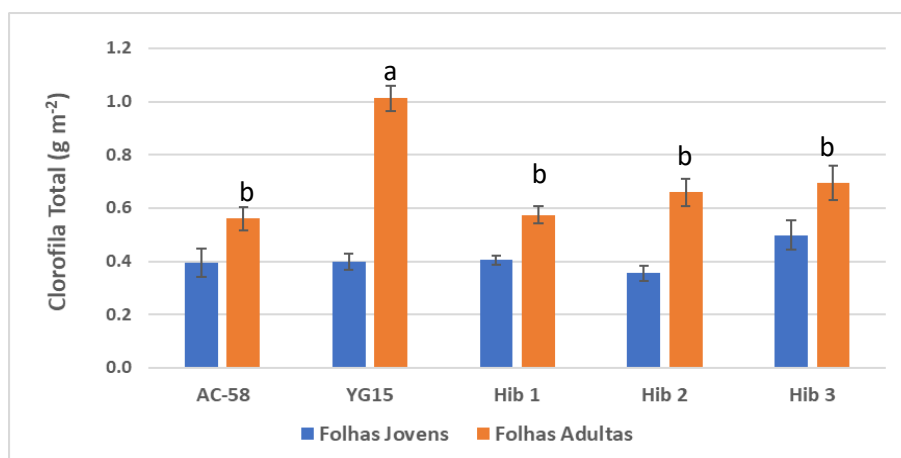
Como esperado, a clorofila *a* manteve-se como o pigmento fotossintético em maior concentração, tanto nas folhas jovens como adultas para todos os clones do ensaio de campo, com uma variação entre 0.23 (Hib 2) a  $0.32 \text{ g m}^{-2}$  (Hib 3) nas folhas jovens e entre 0.37 (AC-58) a  $0.70 \text{ g m}^{-2}$  (YG15) nas adultas. Para a clorofila *b* os valores mínimo e máximo verificaram-se para os mesmos clones nas folhas jovens, com uma variação entre 0.12 e  $0.18 \text{ g m}^{-2}$ . Já nas folhas adultas, a variação da clorofila *b* oscilou entre 0.18 (Hib 1) e  $0.31 \text{ g m}^{-2}$  (YG15) (Quadro 8). A razão entre a clorofila *a* e *b* apresentou menores variações entre clones sem diferenças significativas entre clones para os dois tipos de folhas.

**Quadro 8.** Concentrações de clorofila *a* e *b* (Clof *a* e Clof *b*) e razão entre clorofila *a* e *b* (Clof *a/b*) ( $\text{g m}^{-2}$ ) nas folhas dos clones do ensaio de campo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA a um fator e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

	AC-58	YG15	Hib 1	Hib 2	Hib 3
<b>Folhas jovens</b>					
Clof <i>a</i>	$0.26 \pm 0.04$	$0.26 \pm 0.02$	$0.27 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.04$
Clof <i>b</i>	$0.13 \pm 0.01$ ab	$0.13 \pm 0.01$ ab	$0.14 \pm 0.01$ ab	$0.12 \pm 0.01$ a	$0.18 \pm 0.02$ b
Clof <i>a/b</i>	$1.94 \pm 0.11$	$1.96 \pm 0.06$	$1.93 \pm 0.07$	$1.94 \pm 0.08$	$1.80 \pm 0.10$
<b>Folhas adultas</b>					
Clof <i>a</i>	$0.37 \pm 0.02$ b	$0.70 \pm 0.03$ a	$0.39 \pm 0.02$ b	$0.45 \pm 0.04$ b	$0.46 \pm 0.04$ b
Clof <i>b</i>	$0.19 \pm 0.02$ b	$0.31 \pm 0.01$ a	$0.18 \pm 0.01$ b	$0.21 \pm 0.02$ b	$0.24 \pm 0.03$ ab
Clof <i>a/b</i>	$1.98 \pm 0.07$	$2.28 \pm 0.07$	$2.16 \pm 0.07$	$2.20 \pm 0.07$	$2.02 \pm 0.11$

Relativamente à clorofila total, os valores mínimos e máximos obtidos para as folhas jovens variaram entre 0.4 (Hib 2) e 0.5  $\text{g m}^{-2}$  (Hib 3), não se observando diferenças significativas entre clones.

Ao contrário, as folhas adultas apresentaram diferenças significativas, variando entre 0.56 (AC-58) e 1.01  $\text{g m}^{-2}$  (YG15) (Figura 9).



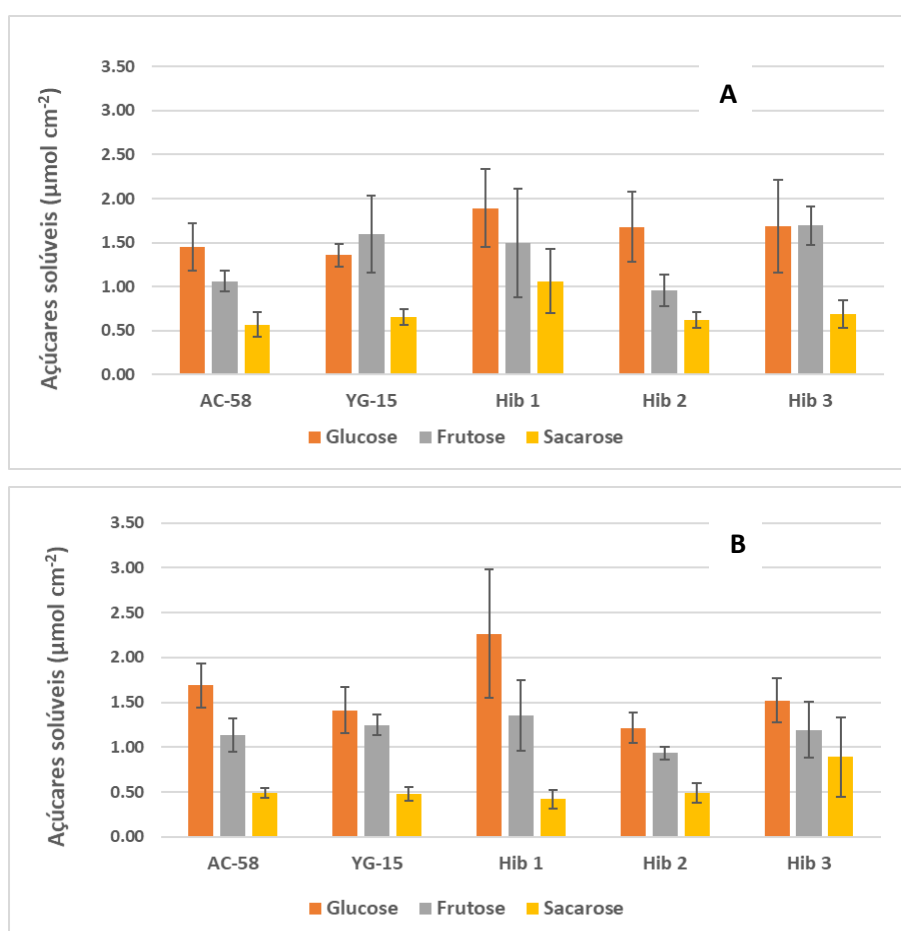
**Figura 9** - Concentração de clorofila total ( $\text{g m}^{-2}$ ) nas folhas dos clones no ensaio de campo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise

estatística foi realizada pelo teste ANOVA a um fator e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.2.3. Açúcares solúveis

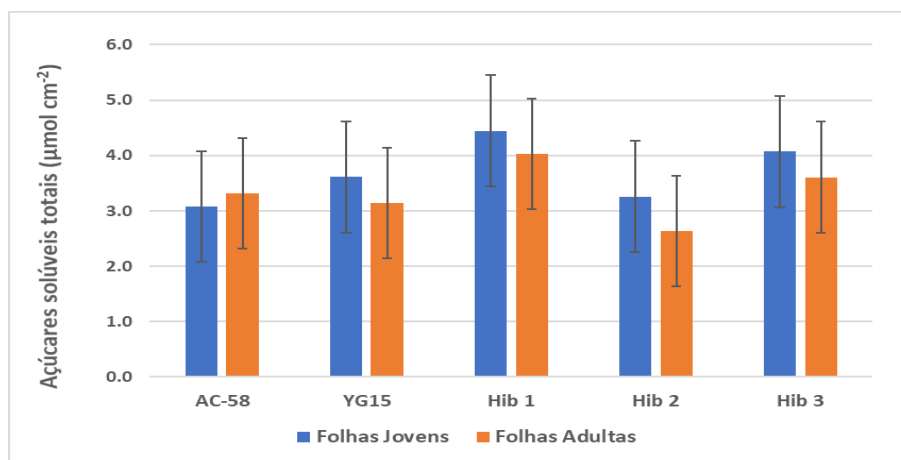
Em geral, no material vegetal do ensaio de campo, a glucose manteve-se como o elemento com maior concentração tanto nas folhas adultas como nas jovens, seguido da frutose e da sacarose (Figura 10 A, B). Não se verificaram diferenças significativas entre clones para nenhum dos açúcares quer nas folhas jovens ou adultas.

Em relação à concentração de açúcares solúveis totais, destaca-se que as folhas jovens apresentaram os valores mais elevados em todos os clones, exceto no clone AC58 (Figura 11) variando entre 3.1 (AC-58) e 4.4  $\mu\text{mol cm}^{-2}$  (Hib 1). No caso das folhas adultas, a concentração total variou entre 2.6 (Hib 2) e 4.0  $\mu\text{mol cm}^{-2}$  (Hib 1). Também para a concentração de açúcares totais não se verificaram diferenças significativas entre clones quer nas folhas jovens ou adultas.



**Figura 10.** Concentração em glucose, frutose e sacarose ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ) das folhas jovens (A) e das folhas adultas (B) do ensaio de campo. A análise estatística foi realizada pelo

teste de Kruskal-Wallis, ANOVA a um fator e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone.



**Figura 11.** Concentração de açúcares solúveis totais ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ) das folhas jovens e adultas dos clones do ensaio de campo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, ANOVA a um fator e teste de Tukey.

#### 3.2.4. Danos de frio

A avaliação da tolerância ao frio dos clones do ensaio de campo foi realizada através de um único teste de frio, em folhas jovens e adultas (totalmente expandidas), à temperatura de  $-4.5 \pm 0.01$  °C.

O clone Hib 3 mostrou ser o mais tolerante ao frio, exibindo a menor percentagem de danos, tanto para as folhas jovens como adultas, com valores inferiores a 50% (Quadro 9). O clone AC-58 apresentou valores de RI próximos de 50% para ambos os tipos de folhas. Todos os restantes clones mostraram valores muito superiores a 50%, para folhas jovens ou adultas, evidenciando uma maior suscetibilidade ao frio.

A relação entre o RI e a concentração de açúcares solúveis presente nas folhas jovens e adultas foi também analisada através de correlações de Pearson. Tal como para o material vegetal de viveiro não se verificaram existir correlações significativas (Quadro 10).

**Quadro 9** – Danos relativos (*Relative Injury*, **RI%**) dos clones do ensaio de campo com base num teste de frio a  $-4.5 \pm 0.01$  °C. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 rametos por clone. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Tukey. Valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ).

ID	RI (%)	
	Folhas jovens	Folhas adultas
AC-58	50.7 $\pm$ 12.9	46.5 $\pm$ 12.3 ab
YG15	74.8 $\pm$ 9.5	65.5 $\pm$ 9.1 ab
Hib 1	66.0 $\pm$ 8.9	74.1 $\pm$ 10.2 a
Hib 2	67.7 $\pm$ 8.9	70.8 $\pm$ 11.3 ab
Hib 3	40.8 $\pm$ 9.5	36.7 $\pm$ 8.8 b

**Quadro 10** – Correlações de Pearson entre os danos relativos de frio (*Relative Injury*, **RI%**) e a concentração de açúcares solúveis e totais para os clones do ensaio de campo ( $r$  = coeficiente de correlação de Pearson).

	r	p-value
<b>Folhas jovens</b>		
Glucose	-0.126	0.51
Frutose	0.076	0.69
Sacarose	0.094	0.62
Açúcares	0.001	0.99
Totais		
<b>Folhas adultas</b>		
Glucose	-0.014	0.94
Frutose	-0.056	0.77
Sacarose	-0.227	0.23
Açúcares	-0.125	0.51
Totais		



#### 4. Discussão

A necessidade de identificar genótipos com maior tolerância ao frio é particularmente importante no caso do eucalipto, uma vez que o número de plantações tem vindo a aumentar nos últimos anos. Essa expansão tem conduzido a que as plantações se estabeleçam em locais com maior probabilidade de ocorrência de temperaturas negativas. Devido à sensibilidade do eucalipto ao frio, o risco de perdas na produtividade e mortalidade é uma realidade atual para os produtores e indústria, agravado pelos efeitos das alterações climáticas e aumento da frequência de geadas súbitas.

Diversos autores têm confirmado a ocorrência de variabilidade intraespecífica em algumas famílias de *E. globulus* aclimatadas a tolerar temperaturas entre -5.2 °C a -8.8 °C (Almeida *et al.*, 1994; Volker, 1994; Moraga *et al.*, 2006; Tibbits *et al.*, 2006; Costa e Silva *et al.*, 2009). A capacidade de tolerar o frio noutras espécies do género *Eucalyptus* tem sido testada com sucesso (Tibbits *et al.*, 1987; Raymond *et al.*, 1992; Volker *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2012; Arnold *et al.*, 2015; Butnor *et al.*, 2019), além de combinações interespecíficas entre *E. globulus* e outras espécies, como *E. nitens* (Volker *et al.*, 1994) ou *E. cypellocarpa* (Almeida *et al.*, 1994). É assim expectável que genótipos diferentes respondam de forma distinta às baixas temperaturas.

No presente estudo, pretendeu-se explorar algum do material vegetal produzido pela Altri quanto à sua capacidade inerente de tolerar temperaturas negativas. Foi comparado o comportamento de um clone puro de *E. globulus*, com 5 famílias de híbridos de *E. globulus*, sem qualquer tipo de aclimação ao frio, em condições de viveiro e de campo. O limite de tolerância ao frio foi definido pela estimativa da TL<sub>50</sub> (temperatura que causa 50% de mortalidade das plantas), através do método da condutividade elétrica (Almeida *et al.*, 1994).

Com base nos testes de frio e dos valores de danos relativos (RI) foram estimadas as TL<sub>50</sub> para os clones testados. No teste de frio realizado à temperatura de -4.1 °C, é de salientar a elevada variabilidade de RI entre os rametos de cada clone em condições de viveiro. Cinco dos clones mostraram um grande erro padrão (de 9.7 a 13.8 %, para o Hib 2 e YG15, respetivamente), sugerindo um grande efeito ambiental ou de efeitos derivados da técnica de propagação vegetativa na resposta de cada rameto ao frio, que se evidenciam sobretudo na temperatura próxima da TL<sub>50</sub>. Os rametos do clone Hib 1B mostraram apenas uma pequena variação nas respostas à temperatura de -4.1 °C (1,0 %) e é de notar que este clone é o mais sensível ao frio e que para esta temperatura

teve os valores de RI mais elevados (83.2%, Quadro 5). Nos testes de temperaturas de -3.1 e de -5.0 °C a variabilidade das respostas dos rametos foi grandemente reduzida com erros padrão entre os 6 e 1 %, respectivamente (exceptuando-se o clone Hib 1A com um valor *outlier* de 10.4 % devido a um rameto super-tolerante). Esta variabilidade associada à temperatura de -4.1 °C, por estar próxima das TL<sub>50</sub> estimadas, sugere que esses efeitos na variabilidade se expressam apenas no limiar de temperatura que define o comportamento de tolerância ou sensibilidade do rameto, i.e., quando consideradas as temperaturas próximas da TL<sub>50</sub>, pequenas variações podem implicar a diferença entre sobrevivência ou mortalidade (Almeida, 1993).

O valor de TL<sub>50</sub> de -4.0 °C observado neste estudo para o AC-58 (*E. globulus*) está de acordo com os resultados reportados por Costa e Silva *et al.* (2009), em que para clones de *E. globulus* não aclimatados foi apurado uma TL<sub>50</sub> de -3.8 °C.

Tibbits *et al.* (1987) determinaram para *E. nittens* sem aclimação, uma TL<sub>50</sub> de -3.4 °C. Também neste caso os valores se comparam aos obtidos para os híbridos com *E. nittens* como um dos progenitores, o Hib 1A e o Hib 1B, com TL<sub>50</sub> de -3.6 °C e -3.4 °C, respetivamente. Também num estudo de Floriani *et al.* (2013), se obteve para *E. dunni* uma TL<sub>50</sub> de -3.87 °C, bastante próximo dos valores de -3.5 °C e -3.7 °C obtidos no nosso estudo para os híbridos Hib 2 e Hib 3, com *E. dunni* como progenitor.

Em contrapartida, em Almeida *et al.* (1994) para 2 famílias de híbridos de *E. cypellocharpa* x *E. globulus* sem aclimação, foram determinadas TL<sub>50</sub> de -4.9 °C e -5.4 °C, valores bastante mais baixos comparativamente aos -4.1 °C observados no presente estudo para o clone YG15. Também, os mesmos autores, para 2 famílias de *E. viminalis* x *E. globulus* estimaram uma TL<sub>50</sub> de -4.6 °C e -5.1 °C, valores distantes do -3.7 °C aqui determinado para o clone Hib 3. Como referido por Tibbits *et al.* (2006), a tolerância às baixas temperaturas é uma característica que em determinadas combinações, tem tendência para a dominância parcial no sentido do progenitor menos resistente. Assim, o menor desempenho dos híbridos em estudo, poderá ser justificado pela maior sensibilidade ao frio por parte do progenitor *E. globulus*.

Apesar da variação na resposta observada ao nível dos rametos (RI) com a aproximação à temperatura letal, não se verificaram diferenças consideráveis entre as TL<sub>50</sub> dos clones em condições de viveiro, sugerindo que os clones estudados apresentam uma resposta semelhante ao congelamento. É possível, no entanto, definir

um ranking dos clones de acordo com a tolerância ao frio apurada, do mais sensível ao mais tolerante:

**6° Hib 1B** |  $TL_{50} = -3.41\text{ }^{\circ}\text{C}$

**5° Hib 2** |  $TL_{50} = -3.52\text{ }^{\circ}\text{C}$

**4° Hib 1A** |  $TL_{50} = -3.59\text{ }^{\circ}\text{C}$

**3° Hib 3** |  $TL_{50} = -3.70\text{ }^{\circ}\text{C}$

**2° AC-58** |  $TL_{50} = -4.02\text{ }^{\circ}\text{C}$

**1° YG15** |  $TL_{50} = -4.09\text{ }^{\circ}\text{C}$

No ranking do material vegetal de viveiro, é perceptível que o YG15 mostrou ser o clone mais tolerante, e o Hib 1B o mais sensível às temperaturas estudadas. Neste caso, o híbrido YG15 apresentou um melhor resultado em relação ao AC-58, no entanto o *E. globulus* puro está apenas uma posição abaixo deste híbrido, com  $0.07\text{ }^{\circ}\text{C}$  de diferença. É de salientar também a importância da amplitude de  $0.68\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre o clone mais sensível e o mais tolerante, uma vez que sujeitar plantas sensíveis a uma diferença de  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  acima da sua temperatura letal, pode ser o suficiente para causar a mortalidade da planta, como reportado por Almeida (1993).

Relativamente aos testes realizados ao material vegetal proveniente do ensaio de campo no Furadouro, visto que apenas foi possível efetuar um único teste à temperatura de  $-4.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a quantificação da mortalidade foi obtida através da determinação dos danos relativos das membranas celulares (RI). Os resultados mostraram que nas folhas adultas, apenas dois clones se mantiveram abaixo do limiar de 50 % de mortalidade, o AC-58 (46.5 %) e o Hib 3 (36.7 %). Nas folhas jovens apenas um clone sobreviveu, o Hib 3, com 40.8 % de danos, embora o AC-58 se tenha mantido bastante próximo do limiar de sobrevivência, com 50.7 % de RI.

É de salientar a considerável variabilidade que ocorreu nos valores de RI em todos os clones, com o erro padrão a variar de 8.8% (Hib 3) a 12.3% (AC-58) nas folhas adultas, e entre 8.9 % (Hib 1 e Hib 2) a 12.9 % (AC-58) nas folhas jovens. Esta elevada dispersão foi causada pela ocorrência de pelo menos um rameto por clone com valores muito baixos de RI, e pela variabilidade geral dentro de cada grupo quanto à resposta ao frio. Quanto à análise estatística dos valores de RI, apenas se destaca a existência de diferenças significativas entre o Hib 1 e o Hib 3 nas folhas adultas, o que à semelhança das plantas em viveiro, também neste caso os resultados sugerem não existir uma diferença clara entre os clones quanto à tolerância ao frio. No entanto, verifica-se que o

Hib 3 mostrou uma tendência para atingir valores médios de RI mais baixos que os restantes clones para a temperatura testada, para ambos os tipos de folha.

Apesar de não ser possível estimar a  $TL_{50}$  em condições de campo e de o RI não ter uma correspondência direta com a tolerância ao frio, é possível elaborar um ranking com base em RI que exprime os danos relativos causados pelo frio nas membranas celulares em folhas jovens e adultas. Apresenta-se esse ranking, do clone com mais danos ao mais resistente:

<b>Folhas Novas</b>	<b>Folhas Adultas</b>
<b>5° YG15</b>   RI % = 74.8 %	<b>5° Hib 1</b>   RI % = 74.1 %
<b>4° Hib 2</b>   RI % = 67.7 %	<b>4° Hib 2</b>   RI % = 70.8 %
<b>3° Hib 1</b>   RI % = 66.0 %	<b>3° YG15</b>   RI % = 65.5 %
<b>2° AC-58</b>   RI % = 50.7 %	<b>2° AC-58</b>   RI % = 46.5 %
<b>1° Hib 3</b>   RI % = 40.8 %	<b>1° Hib 3</b>   RI % = 36.7 %

Claramente, em ambos os tipos de folhas, destacam-se os clones Hib 3 e o AC-58 com respostas de RI semelhantes e inferiores aos restantes clones, com danos abaixo dos 50% ou no limiar de sobrevivência.

Comparando os rankings das plantas de viveiro e de campo, a hierarquia não se manteve estável, sobretudo pela aparente maior suscetibilidade do YG15 no campo. No entanto, convém reafirmar que a relação entre RI e  $TL_{50}$  não é linear e que é provável que com a realização de um maior número de testes de frio, este ranking seja alterado relativamente à efetiva tolerância ao frio.

É de notar que os testes de frio foram realizados sem qualquer período de aclimação, apenas considerando a resistência inerente de cada clone. É conhecido que a aclimação provoca uma redução no valor do  $TL_{50}$  (Tibbits *et al.*, 1987; Almeida *et al.*, 1994) e é expectável que caso expostos a um abaixamento gradual de temperatura durante um determinado período de tempo, os clones manifestassem uma  $TL_{50}$  inferior às encontradas neste estudo. Seria também de esperar que em resultado dessa aclimação, a combinação de alterações fisiológicas e metabólicas implicasse respostas distintas entre os diferentes genótipos (Costa e Silva *et al.*, 2009).

Para além de fatores genéticos a capacidade de resposta ao frio por parte das plantas está também relacionada com o seu estado fisiológico. Uma forte correlação entre a

acumulação de açúcares solúveis e o aumento da tolerância ao frio tem sido reportada (Almeida *et al.*, 1994; Leborgne *et al.*, 1995; Moraga *et al.*, 2006; Floriani *et al.*, 2013), sugerindo uma relação inversa, com o aumento do nível de açúcares solúveis com a diminuição da  $TL_{50}$ , atuando como crioprotetores dos tecidos vegetais.

No presente estudo, determinaram-se os açúcares solúveis durante a fase de realização dos testes de frio. Apesar de terem sido medidos apenas uma vez, numa fase inicial, pretendeu-se também avaliar a relação entre a concentração de açúcares presente nos tecidos foliares e a sua tolerância às temperaturas negativas.

Considerando as plantas de viveiro, o Hib 3 é o clone com maior concentração em açúcares solúveis totais, seguido do AC-58, tendo o Hib 1B apresentado o menor valor. Apesar de não se verificarem diferenças significativas entre os clones, foi visível uma tendência do Hib 3 para uma maior concentração em açúcares totais relativamente aos restantes clones, sendo a concentração superior da glucose em relação aos outros açúcares a principal responsável por este resultado. Os valores obtidos para os açúcares solúveis totais estão de acordo com os determinados em Costa e Silva *et al.* (2009). É de notar que a quantidade de açúcares solúveis presente numa planta corresponde a um equilíbrio entre a taxa de fotossíntese, o consumo por respiração e a exportação para partes da planta em crescimento ou com necessidades específicas (Costa e Silva *et al.* 2009).

Neste estudo e para o material vegetal de viveiro, não foi observada uma correlação entre a concentração de açúcares presente nos tecidos foliares com a sua tolerância ao frio para nenhum dos componentes (glucose, frutose e sacarose), e inclusivamente também para o seu somatório. Apesar do Hib 3 e o AC-58 se encontrarem nas primeiras 3 posições do ranking de  $TL_{50}$ , e destes serem os clones com os maiores valores de concentração em açúcares totais, o YG15 sendo o clone mais tolerante, no caso dos açúcares manteve-se numa posição intermédia. Para os menos tolerantes é mais perceptível esta relação, uma vez que os clones mais sensíveis (Hib 1B e Hib 2) são também os que têm menor concentração em açúcares.

Nas plantas provenientes do ensaio de campo, também não se verificou a existência de correlação entre a concentração em açúcares e a  $TL_{50}$ . Para ambas as tipologias de folha, além do clone mais resistente (Hib 3) não ter correspondido à maior concentração em açúcares, também os clones mais sensíveis (YG15 e Hib 1 para as folhas jovens e

adultas respetivamente) não corresponderam à menor concentração em açúcares solúveis totais.

Para definir o estado fisiológico das plantas, a quantificação das clorofilas é um aspeto importante, uma vez que estes pigmentos intervêm diretamente na atividade fotossintética, sendo responsáveis pela absorção da energia luminosa (Taiz & Zeiger, 2002). Para todos os clones considerados, em ambas as condições de viveiro e de campo, a concentração de clorofila *a* foi superior à da clorofila *b*. Entre alguns clones foi observada diferença significativa quanto à clorofila total, o que revela a existência de variação entre génotipos. Taiz & Zeiger (2002) também declaram que em situação de plantas sujeitas a um maior ensombramento, ocorre o aumento da proporção relativa de clorofila *b*. Neste caso, os valores obtidos pela razão clorofila *a/b* indicam um maior peso da clorofila *a* em relação à clorofila *b*, o que permite assumir que as plantas se mantiveram num ambiente não deficitário de luz, com condições de luminosidade adequadas.

A área foliar específica (SLA), reflete a espessura e tamanho da folha, sendo um bom indicador das condições de crescimento das plantas, com vários autores a relacionar a SLA com diversos fatores ambientais. Ackerly *et al.* (2001) demonstrou que a SLA se relaciona negativamente com a radiação incidente, indicando que espécies com folhas mais espessas e/ou mais densas (menor área por peso) ocupam preferencialmente encostas mais expostas à luz solar. Valores de SLA inferiores mostraram contribuir para uma maior longevidade das folhas e para o aumento da retenção de nutrientes. Por sua vez, valores crescentes de SLA relacionam-se com uma concentração superior em azoto foliar e uma maior eficiência fotossintética (Reich *et al.*, 1997; Gulías *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2019), elementos determinantes na produtividade. Estudos realizados em *E. globulus* (Pita & Pardos, 2001) e *E. camaldulensis* Dehnh (Gibson *et al.*, 1991), sujeitos a défice hídrico, reportaram que a resposta à seca ocorre principalmente através de alterações morfológicas, como a diminuição da SLA.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que em ambos os lotes de material vegetal de viveiro e de campo, os valores de SLA foram pouco variáveis entre clones. A exceção ocorreu para o AC-58, que no material de viveiro apresentou uma significativa maior área por peso de folha, ou seja, menor SLA.

Os valores de SLA do material vegetal de campo demonstraram ser consideravelmente inferiores aos do viveiro. Este resultado é previsível, uma vez que as plantas no viveiro

estão sujeitas a condições ótimas de crescimento, sem se encontrarem expostas a fatores de stress ambientais. No ensaio de campo, as plantas estão sujeitas a períodos de seca temporários, além da exposição direta à radiação solar. Esta combinação de fatores leva a uma resposta de crescimento com redução da área por peso do tecido foliar (decréscimo da SLA), reduzindo a perda de calor por convecção, facilitando a manutenção do balanço energético das folhas e melhorando a eficiência fotossintética do uso da água (Parkhurst & Loucks, 1972; Givnish & Vermeij, 1976).

## 5. Conclusão

Os diversos mecanismos que permitem a uma planta tolerar as baixas temperaturas são complexos, e a sua capacidade de efetivamente limitar os danos causados pelo frio dependem em grande parte da espécie, do seu estado de desenvolvimento e de um estado fisiológico adequado. O conhecimento prévio da resposta fisiológica das plantas ao stress, além do seu grau de sensibilidade ao frio, é fundamental aquando da introdução em novas áreas de produção, a que muitas vezes correspondem condições edafo-climáticas limitantes.

Sendo este o ponto de partida de um estudo em que se pretende caracterizar e identificar os clones mais tolerantes ao frio de um conjunto de cruzamentos realizados pela Altri Florestal, optou-se por numa primeira fase sujeitar o material vegetal selecionado ao abaixamento súbito da temperatura, sem processo de aclimação.

Em termos gerais, apesar de os clones em estudo não se terem diferenciado significativamente na sua capacidade de tolerância ao frio ( $TL_{50}$ ), alguns aspetos importantes foram evidenciados por este trabalho: 1) A amplitude de  $TL_{50}$  entre o clone mais sensível e o mais tolerante foi de 0.68 °C o que permite prever uma variabilidade interessante a ser explorada em termos de melhoramento, sobretudo considerando uma amostragem em larga escala; 2) Esta amplitude de  $TL_{50}$  entre genótipos é especialmente relevante se considerarmos a suscetibilidade ao frio do *E. globulus* e as temperaturas que ocorrem nas condições naturais de plantação desta espécie em Portugal; 3) O clone puro *E. globulus* (AC-58) da população de produção da ALTRI, obteve resultados promissores quanto à sua capacidade de tolerar as baixas temperaturas, tanto nas condições de viveiro como de campo, permanecendo em ambos na segunda posição do ranking de tolerância ao frio.

Pode concluir-se que embora alguns híbridos tenham mostrado alguma tolerância ao frio, a sua superioridade não se manteve estável entre o viveiro e o campo, ao contrário do clone puro de *E. globulus*. Uma vez que o processo de aclimação pode ter efeitos no aumento da tolerância ao frio, é de esperar que caso as plantas estivessem sujeitas a um abaixamento gradual de temperatura, a posição dos clones nos rankings se alterasse.

Para tirar conclusões mais detalhadas e complementar a análise da tolerância destes clones às baixas temperaturas, seria interessante aprofundar este estudo, por exemplo sujeitando os mesmos clones a um período de aclimação controlado. Esta condição iria permitir à planta ativar os seus mecanismos de defesa, o que possibilitaria avaliar as possíveis alterações do seu estado fisiológico antes e após o stress. Em alternativa, outra forma de complementar este trabalho seria repetir os testes de frio aos mesmos clones durante o inverno. Nestas condições, mesmo sem garantir que todas as plantas se encontrem no mesmo estado de aclimação, a velocidade com que aclimatam é um fator determinante para a sobrevivência das plantas, o que permitiria também identificar os clones que sujeitos ao mesmo período de frio, seriam menos suscetíveis a danos.

## 6. Bibliografia

Ackerly, D., Knight, C., Weiss, S., Barton, K. & Starmer, K. (2002). Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia*, 130(3): 449-457.

Almeida, M.H. (1993). Estudo da variabilidade geográfica em *Eucalyptus globulus* Labill. Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, pp. 196.

Almeida, M. H., Araújo, C., Araújo, J. A., Costa e Silva, F., Neves, I., Paiva, V., Santiago, A. & Ribeiro, D. (2005). Melhoramento genético do eucalipto: que impacto na realidade? *A Floresta e as Gentes. 5º Congresso Florestal Nacional*. Eds. R. Silva e F. Páscoa. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais, Viseu, pp. 145-146.

Almeida, M. H., Chaves, M. M. & Silva, J. C. (1994). Cold acclimation in eucalypt hybrids. *Tree Physiology*, 14(7-8-9): 921-932.



Altri (2019). Gestão Florestal: Investigação florestal. Disponível em: <http://www.altri.pt/pt/sustainability-and-environment/forest-management/research-and-development>

Alves, A. M., Pereira, J. S. & Silva, J. M. N. (2007). A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal. *O Eucalipto em Portugal. Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Eds. A.M. Alves, J.S. Pereira e J.M.N. Silva. ISAPress, Lisboa, pp. 13-26.

Agência Portuguesa do Ambiente (2013). Relatório do Estado do Ambiente 2013. Disponível em: [https://www.apambiente.pt/\\_zdata/DESTAQUES/2014/REA\\_2013\\_Final\\_30dezembro.pdf](https://www.apambiente.pt/_zdata/DESTAQUES/2014/REA_2013_Final_30dezembro.pdf)

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 373-399.

Arnold, R., Li, B., Luo, J., Bai, F. & Baker, T. (2015). Selection of cold-tolerant *Eucalyptus* species and provenances for inland frost-susceptible, humid subtropical regions of southern China, *Australian Forestry*, 78(3): 180-193.

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1): 1-15.

Battaglia, M., Cherry, M. L., Beadle, C. L., Sands, P. J. & Hingston, A. (1998). Prediction of leaf area index in eucalypt plantations: effects of water stress and temperature. *Tree Physiology*, 18(8-9): 521-528.

Binkley, D., Stape, J. L. & Ryan, M. G. (2004). Thinking about efficiency of resource use in forests. *Forest Ecology and Management*, 193(1-2): 5-16.

Borrhalho, N. M. G., Almeida, M. H. & Potts, B. M. (2007). O melhoramento do eucalipto em Portugal. *O Eucalipto em Portugal. Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Eds. A.M. Alves, J.S. Pereira e J.M.N. Silva. ISAPress, Lisboa, pp. 61-110.

Burke, M. J., Gusta, L. V., Quamme, H. A., Weiser, C. J., & Li, P. H. (1976). Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 27(1): 507-528.

Butnor, J. R., Johnsen, K. H., Anderson, P. H., Hall, K. B., Halman, J. M., Hawley, G. J., Maier, C. A. & Schaberg, P. G. (2019). Growth, photosynthesis, and cold tolerance of *Eucalyptus benthamii* planted in the piedmont of North Carolina. *Forest Science*, 65(1), 59-67.

Celpa - Associação Nacional da Indústria Papeleira (2018). Boletim Estatístico 2017. Disponível em: [http://www.celpa.pt/wp-content/uploads/2018/10/Boletim\\_WEB-2.pdf](http://www.celpa.pt/wp-content/uploads/2018/10/Boletim_WEB-2.pdf)

Chen, Y., Jiang, J., Chang, Q., Gu, C., Song, A., Chen, S., Dong, B. & Chen, F. (2014). Cold acclimation induces freezing tolerance via antioxidative enzymes, proline metabolism and gene expression changes in two chrysanthemum species. *Molecular biology reports*, 41(2): 815-822.

Cheng, D., Zhang, Z., Zhou, S., Peng, Y., & Zhang, L. (2019). Relationships between leaf physiognomy and sensitivity of photosynthetic processes to freezing for subtropical evergreen woody plants. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 12(6): pp. 551.

Chinnusamy, V., Zhu, J. & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10): 444-451.

Chinnusamy, V., Zhu, J. K., & Sunkar, R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 639, 39–55. doi:10.1007/978-1-60761-702-0\_3

Close, D. C., & Beadle, C. L. (2003). The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2): 149-161.

Coopman, R. E., Jara, J. C., Escobar, R., Corcuera, L. J. & Bravo, L. A. (2010). Genotypic variation in morphology and freezing resistance of *Eucalyptus globulus* seedlings subjected to drought hardening in nursery. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1): 5-6.

Costa e Silva, F.M. (2008). Diferenças na resposta a défices hídricos e a baixas temperaturas em dois clones de *Eucalyptus globulus* Labill. com contrastante sensibilidade à secura. Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Costa e Silva, F. C., Shvaleva, A., Almeida, M. H., Chaves, M. M. & Pereira, J. S. (2007). Responses to chilling of two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. *Functional plant biology*, 34(9): 793-802.

Costa e Silva, F., Shvaleva, A., Broetto, M. F., Ortuño, M. F., Rodrigues, M. L., Almeida, M. H., Chaves, M. M. & Pereira, J. S. (2009). Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. *Tree physiology*, 29(1): 77-86.

de Assis T.F. (2000). Production and use of *Eucalyptus hybrids* for industrial purposes. *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium*. Eds. Dungey, H.S., Dieters, M.J. and Nikles, D.G., 9–14th April 2000, Noosa, Queensland, Australia, pp. 63–74.

Dexter, S. T., Tottingham, W. E. & Graber, L. F. (1930). Preliminary results in measuring the hardness of plants. *Plant physiology*, 5(2): 215.

Dickinson, G. R., Lee, D. J. & Wallace, H. M. (2012). The influence of pre-and post-zygotic barriers on interspecific *Corymbia* hybridization. *Annals of Botany*, 109(7): 1215-1226.

Duryea, M. L. & McClain, K. M. (1984). Altering seedling physiology to improve reforestation success. In *Seedling physiology and reforestation success*. Eds. Duryea M.L., Brown G.N. Forestry Sciences, Springer, Dordrecht, vol 14.

Floriani, M. M. P., Steffens, C. A., Djalma, M. C., do Amarante, C. V. T., Pikart, T. G. & dos Santos Ribeiro, M. (2013). Relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. *Ciência Florestal*, 23(1): 165-174.

Gibson, A., Hubick, K. T. & Bachelard, E. P. (1991). Effects of abscisic acid on morphological and physiological responses to water stress in *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. *Functional Plant Biology*, 18(2): 153-163.

Givnish, T. J. & Vermeij, G. J. (1976). Sizes and shapes of liane leaves. *The American Naturalist*, 110(975): 743-778.

Griffin, A. R., Burgess, I. P. & Wolf, L. (1988). Patterns of Natural and Manipulated Hybridisation in the Genus *Eucalyptus* L'hérit.-1 A Review. *Australian Journal of Botany*, 36(1): 41-66.

Gulías, J., Flexas, J., Mus, M., Cifre, J., Lefi, E. & Medrano, H. (2003). Relationship between maximum leaf photosynthesis, nitrogen content and specific leaf area in Balearic endemic and non-endemic Mediterranean species. *Annals of Botany*, 92(2): 215-222.

ICNF (2013). IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares. [pdf], 34 pp, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Lisboa. Disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/florestas/ifn/resource/doc/ifn/ifn6-res-prelimv1-1>

Instituto Nacional de Estatística, I.P. (INE, I.P.) (2013). Estatísticas do Ambiente 2012. Lisboa-Portugal

IPCC (2014): Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 151.

IPMA (2012). Boletim Climatológico Mensal – fevereiro 2012. Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Lisboa. Disponível em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20120326/EKbVRptQqJCbnNioCWdr/cli\\_20120201\\_20120229\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20120326/EKbVRptQqJCbnNioCWdr/cli_20120201_20120229_pcl_mm_co_pt.pdf)

IPMA (2012). Boletim Climatológico Sazonal – Inverno 2011/2012. Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Lisboa. Disponível em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20120312/pprBiMvaUwzTIRosqEcR/cli\\_20111201\\_20120229\\_pcl\\_sz\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20120312/pprBiMvaUwzTIRosqEcR/cli_20111201_20120229_pcl_sz_co_pt.pdf)

Jones, M. G. K., Outlaw, W. H., & Lowry, O. H. (1977). Enzymic assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiology*, 60(3): 379-383.

Keller, G., Marchal, T., SanClemente, H., Navarro, M., Ladouce, N., Wincker, P., Arnaud, C., Teulières, C. & Marqué, C. (2009). Development and functional annotation of an

11,303-EST collection from Eucalyptus for studies of cold tolerance. *Tree Genetics & Genomes*, 5(2): 317-327.

Larcher, W. (1982). Typology of freezing phenomena among vascular plants and evolutionary trends in frost acclimation. *Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop implications*, 2: 417-26.

Leborgne, N., Teulieres, C., Travert, S., Rols, M. P., Teissie, J. & Boudet, A. M. (1995). Introduction of specific carbohydrates into Eucalyptus gunnii cells increases their freezing tolerance. *European Journal of Biochemistry*, 229(3): 710-717.

Leslie, A., Mencuccini, M. & Perks, M. P. (2014). Frost damage to eucalypts in a short-rotation forestry trial in Cumbria (England). *iForest: Biogeosciences and Forestry*, 7: 156-161.

Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol. I *Chilling, freezing, and high temperature stress*. Academic Press, London. 497 pp.

Li, B., Arnold, R., Luo, J. & Li, Z. (2012). Genetic variation in growth, cold tolerance and coppicing in *Eucalyptus dunnii* in trials in Hunan, China. *Australian forestry*, 75(4): 215-224.

Marques, H., Pinto, G., Pinto, P. & Teixeira, C. (2012). Regiões de Proveniência - Portugal. Projecto – DEFOR INTERREG III B SUDOE DEFOR SO2/1.3/F64. “The contribution of research for the development and Competitiveness of Southwest European forest sector”. Disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/florestas/gf/ps/rp/resource/doc/reg-prov/reg-prov-2012jan30>

Melo-Abreu, J.P. (1985). As Geadas. Conceitos, Génese, Danos e Métodos de Protecção. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, pp. 219.

Melo-Abreu, J.P. de; Ribeiro, A.C. (2010). Os danos de geada: conceitos, mecanismos e modelos de simulação. *Clima e Recursos Naturais: Conferências de Homenagem ao professor Doutor Dionísio Gonçalves*. Bragança: Instituto Politécnico, pp. 141-166.

Melo-Abreu, J.P., Ribeiro, A.C. & Monteiro, A.M. (2000). Protecção das culturas contra as geadas. DRATM, Ministério da Agricultura, pp. 7.

Moraga, S., Escobar, R. & Valenzuela, A. (2006). Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3).

Navarrete-Campos, D., Bravo, L. A., Rubilar, R. A., Emhart, V., & Sanhueza, R. (2013). Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. *New Forests*, 44(1): 119-134.

Osório, M.L. (1994). Fotossíntese e aclimação a temperaturas elevadas em *Lupinus albus* L. e *Vitis vinifera* L. *PhD Thesis*. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, pp. 211

Parkhurst, D. F. & Loucks, O. L. (1972). Optimal leaf size in relation to environment. *The Journal of Ecology*, 60(2): 505-537.

Pereira, J. S. (2007). Uma espécie altamente produtiva. *Pinhais e eucaliptais - a floresta cultivada*. Eds. Silva, Joaquim Sande. Coleção Árvores e Florestas de Portugal, Público: Fundação luso-americana para o desenvolvimento, Lisboa, 157-183.

Pita, P. & Pardos, J. A. (2001). Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiology*, 21(9): 599-607.

Potts, B. M. & Dungey, H. S. (2004). Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New Forests*, 27(2): 115-138.

Potts, B., Hamilton, M. & Blackburn, D. (2011). Genetics of Eucalypts: Traps and Opportunities. *Developing a eucalypt resource: learning from Australia and elsewhere*. Ed. Walker, J., Wood Technology Research Centre, University of Canterbury, New Zealand, pp. 1-27.

Potts, B. M., Volker, P. W., & Dungey, H. S. (1992). Barriers to the production of interspecific hybrids in *Eucalyptus*. *Mass production technology for genetically improved fast-growing forest tree species*, AFOCELIUFRO Symposium, Bordeaux, France, pp. 193–204

Potts B. M., Volker, P. W., Tilyard, P. A. & Joyce, K. (2000). The genetics of hybridisation in the temperate *Eucalyptus*. *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees*.

*Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium*, 9–14th April 2000, Noosa, Queensland, Australia, pp. 200–211.

Pryor, L. D. (1957). Selecting and breeding for cold resistance in *Eucalyptus*. *Silvae Genetica*, 6: 98-109.

Raymond, C. A., Harwood, C. E., & Owen, J. V. (1986). A conductivity method for screening populations of eucalypts for frost damage and frost tolerance. *Australian Journal of Botany*, 34(4): 377-393.

Reich, P. B., Walters, M. B., & Ellsworth, D. S. (1997). From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25): 13730-13734.

Ruelland, E., Vaultier, M. N., Zachowski, A., & Hurry, V. (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in botanical research*, 49: 35-150.

Sakai, A. & Larcher, W. (1987). Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Ecological Studies*, Springer-Verlag, Berlin, 62: 321.

Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109: 54-61.

Scarascia-Mugnozza, G., Valentiny, R., Kuzminsky, E., & Giordano, E. (1989). Freezing mechanisms, acclimation processes and cold injury in Eucalyptus species planted in the Mediterranean region. *Forest ecology and management*, 29(1-2): 81-94.

Silva J. S., Mendes A. C., Oliveira A. C., Fabião A., Correia A.V., Aguiar C., Capelo J. & Catry F. (2007). Pinhais e Eucaliptais - A floresta cultivada. Coleção Árvores e Florestas de Portugal, Público: Fundação luso-americana para o desenvolvimento, Lisboa.

Snyder, R.L. & Melo-Abreu, J.P. (2005). Frost Protection: Fundamentals, Practice and Economics. United Nations, Food and Agriculture Organization, Rome, 1: 1-240.

Snyder, R. L., Paw, U., & Thompson, J. F. (1987). Passive frost protection of trees and vines. *Leaflet-University of California, Cooperative Extension Service (USA)*.

Soares, P., Tomé, M., & Pereira, J. S. (2007). A produtividade do eucaliptal. *O Eucaliptal em Portugal. Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Eds. A.M. Alves, J.S. Pereira e J.M.N. Silva. ISAPress, Lisboa, pp. 27-60.

Steponkus, P. L., & Webb, M. S. (1992). Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. *Water and life*. Eds. Somero, G.N., Osmond, C.B., Bolis C.L. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 338–362

Stitt, M., Bulpin, P. V. & Apprees, T. (1978). Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 544(1): 200-214.

Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R. & Heldt, H. W. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzimology*, 174: 518-552.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*, Ed. 3, Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA, 690 pp.

Teulières C., Bossinger, G., Moran, G. & Marque, C. (2007). Stress studies in *Eucalyptus*. *Plant Stress, Global Science Books*, 1(2): 197–215

Theocharis, A., Clément, C., & Barka, E. A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235(6): 1091-1105.

Tibbits, W. N., Potts, B. M., & Savva, M. H. (1991). Inheritance of freezing resistance in interspecific F1 hybrids of *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(1): 126-135.

Tibbits, W. N., & Reid, J. B. (1987). Frost Resistance in. *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden: Physiological Aspects of Hardiness. *Australian Journal of Botany*, 35(3): 235-250.

Tibbits, W. N., & Reid, J. B. (1987). Frost resistance in *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden: Genetic and seasonal aspects of variation. *Australian Forest Research*, 17(1): 29-47.



Tibbits, W. N., White, T. L., Hodge, G. R., & Borralho, N. M. (2006). Genetic variation in frost resistance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* assessed by artificial freezing in winter. *Australian Journal of Botany*, 54(6): 521-529.

Thomashow, M. F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant physiology*, 118(1): 1-8.

Tomé, M. (1994). Productivity of *Eucalyptus globulus* plantations in central Portugal. *Eucalyptus for biomass production*. Eds. Pereira J.S., Pereira H. Commission of the European Communities and Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, pp. 31-46.

Valentini, R., Mugnozza, G. S., Giordano, E., & Kuzminsky, E. (1990). Influence of cold hardening on water relations of three *Eucalyptus* species. *Tree physiology*, 6(1): 1-10.

Volker, P. W. (1995). Evaluation of *Eucalyptus nitens* x *globulus* for commercial forestry. *Eucalypt plantations: improving fibre yield and quality*. IUFRO Conference Hobart, Tasmania (CRC for Temperate Hardwood Forestry).

Volker, P. W., Owen, J. V., & Borralho, N. M. G. (1994). Genetic variances and covariances for frost tolerance in *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Silvae Genetica*, 43: 366-366.

Volker, P. W., Potts, B. M., & Borralho, N. M. (2008). Genetic parameters of intra-and inter-specific hybrids of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Tree Genetics & Genomes*, 4(3): 445-460.

Wan, X., Zwiazek, J. J., Lieffers, V. J., & Landhäusser, S. M. (2001). Hydraulic conductance in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings exposed to low root temperatures. *Tree Physiology*, 21(10): 691-696.

Zhu, J., Dong, C. H., & Zhu, J. K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current opinion in Plant Biology*, 10(3): 290-295.